ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

БОРИСОВА СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК И ПОЛУЧЕНИЯ СЕКРЕТИРУЕМЫХ СТРЕСС-БЕЛКОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*

1.5.11 – Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Волох О.А.

Саратов – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Ежегодная регистрация 1000–4000 случаев туляремии в мире [Гаевская Н.Е. и др., 2025] связана с устойчивостью природных очагов инфекции, определяемой биологическими особенностями возбудителя [Steiner D.J. et al., 2014; Travis B.A. et al., 2021; Rouco C. et al., 2023]. В связи с этим изучение адаптационных механизмов и факторов патогенности туляремийного микроба остается актуальной научной задачей.

Важной характеристикой рода *Francisella* является способность инфицировать широкий спектр живых организмов: простейших, насекомых, клещей, рыб, амфибий, птиц и млекопитающих, включая человека, а также реплицироваться в эукариотических клетках [Kubelkova K. et al., 2021]. Попадая в среду фагоцитирующей клетки, возбудитель туляремии подвергается воздействию нейтрализующего защитного механизма макрофагов [Radlinski L.C. et al., 2018], в ответ на который активируются особые детерминанты устойчивости, направленные на инактивацию механизмов естественной противоинфекционной резистентности и минимизацию вреда от внешнего воздействия [Steiner D.J. et al., 2014; Travis B.A. et al., 2021]. Ключевую роль здесь играют секретируемые антигены, которые не только обеспечивают защиту бактерии от патогеннейтрализующих механизмов хозяина, но и активно модулируют иммунный ответ, определяя особенности как врожденного, так и приобретенного иммунитета [Klinman D.M. et al., 1999; Alqahtani M. et al., 2018; Kubelkova K. et al., 2021].

Стресс-белки являются детерминантами устойчивости туляремийного микроба к неблагоприятным условиям окружающей среды и определены у *F. tularensis* всех подвидов [Rowe H.M. et al., 2015; Ma Z. et al., 2016; Robert C.B. et al., 2017; Honn M. et al., 2017]. Одним из ключевых стресс-белков является шаперонный комплекс GroEl/GroEs, играющий центральную роль в клеточном ответе на тепловой шок и поддержании белкового гомеостаза. Он обеспечивает защиту клетки от повреждений, регулируя экспрессию генов, кодирующих белки семей-

ства HSP_{60}, которые критически важны для клеточного выживания в стрессовых условиях и обладают способностью активировать макрофаги человека [Noah C.E. et al., 2010, Ma Z. et al., 2019]. Также немаловажную роль играет бактериоферритин (Bfr) – белок, который кроме минерализации токсичного для клетки Fe^{2+}, способствует удалению H_2O_2 из цитоплазмы и, следовательно, уменьшению концентрации активных форм кислорода [Fletcher J.R. et al., 2018]. Известно, что белки теплового шока выделяются в окружающую среду. Так, антигены Bfr, GroEl и DnaK были обнаружены с помощью метода двумерного электрофореза в белковом пуле, полученном из безмикробного фильтрата культуральной среды *F. tularensis* [Lee B.Y. et al., 2006]. Таким образом, данные белки могут служить маркерами стрессового воздействия на возбудителя туляремии.

Вышеописанное позволяет говорить о востребованности дальнейшего изучения свойств экскретируемых антигенов туляремийного микроба, в особенности для разработки новых диагностических систем и профилактических препаратов.

Важнейшей характеристикой бактериальной субпопуляции является функциональное состояние микробных клеток в ней, поскольку оно определяет способность отдельно взятой клетки и всей субкультуры выполнять свойственную им физиологическую функцию. Изучение этого параметра является необходимым для оптимизации процесса культивирования микроорганизмов, разработки управляемого синтеза протективных антигенов, перспективных для создания профилактических и диагностических препаратов. Важным аспектом контроля качества является оценка стабильности свойств штаммов-продуцентов иммунобиологических препаратов при длительном хранении [Соловьев Е.А. и др., 2015; Саяпина Л.В. и др., 2022]. В настоящее время для оценки функционального состояния клеток используются подходы, которые основаны на цитохимических (восстановление тетразолиевого красителя живыми клетками), биохимических (способность к деградации различных веществ) и цитоэнзиматических методах [Stockert J.C. et al., 2018]. Такие методы позволяют визуально оценивать жизнеспособность клеток и их активность, предполагая при этом обработку клеток специальными химиче-

скими препаратами для выявления специфической окраски. К недостаткам таких методов можно отнести субъективность полученной оценки.

Для изучения влияния внешних факторов на бактериальные клетки разработаны прямые и непрямые методы, в частности культивирование на питательных средах, которое для *F. tularensis* занимает до 3–5 суток и дает только косвенные данные о жизнеспособности [Олсуфьев И.Г., 1975]. Современные молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР, позволяют оценивать экспрессию генов стресс-белков (*iglC, fopA, bfpR*) в ответ на изменения среды [Brudal E. et al., 2013], при этом концентрация ДНК должна быть высокой.

Электрооптический анализ представляет собой один из современных биофизических методов, активно применяющихся для оценки физиологического состояния и жизнеспособности бактериальных клеток [Игнатов С.Г., 2007]. Несмотря на его сравнительно недавнее внедрение в исследования возбудителя туляремии, была отмечена эффективность данного метода при оценке физиологического состояния бактериальных клеток на различных этапах производства туляремийной вакцины [Бибиков Д.Н., 2021]. Существующая база знаний позволяет оценить его возможность для определения физиологического состояния клеток туляремийного микроба при взаимодействии со стресс-факторами в режиме реального времени.

Актуальным направлением в исследовании стратегий выживания *F. tularensis* и механизмов его адаптации является применение комплексного подхода, объединяющего современные молекулярно-генетические, биофизические и иммунохимические методы для многоуровневого анализа - от молекулярных процессов до клеточных взаимодействий.

Цель исследования: разработать комплексный методический подход для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* при стрессовых воздействиях, получить секретируемые стресс-белки туляремийного микроба, определить их прикладной потенциал.

Задачи исследования:

1. Разработать способ определения уровня экспрессии генов стресс-белков (*groEl*, *bfr*, *rpoH*) молекулярно-генетическими методами (ОТ-ПЦР; цкПЦР).

2. Экспериментально обосновать использование метода электрооптического анализа для определения физиологического состояния клеток туляремийного микроба в стресс-условиях.

3. Оценить особенности экспрессии генов стресс-белков *F. tularensis* разных штаммов в стрессовых условиях: температурный стресс, перекисное окисление, взаимодействие с антибиотиками, клетками макроорганизма.

4. Разработать эффективный способ получения секретируемых стрессовых белков туляремийного микроба (HSP, GroEl/GroEs, Bfr), изучить их свойства, участие в формировании иммунитета к туляремии и диагностическую значимость.

5. Определить прикладной потенциал разработанного комплексного методического подхода для оценки функционального состояния клеток *F. tularensis* при стрессовых воздействиях.

Научная новизна

С использованием впервые сконструированных специфичных праймеров и зондов к ключевым генам стресс-ответа (*bfr, groEl, rpoH*) определен уровень экспрессии этих генов у *F. tularensis* с применением ОТ-ПЦР и цкПЦР. Показано, что разработанная система позволяет эффективно контролировать динамику экспрессии генов-регуляторов стрессовой реакции у туляремийного микроба, что имеет большое значение для изучения его адаптационных механизмов.

Для определения физиологического состояния клеток туляремийного микроба при взаимодействии со стресс-факторами в режиме реального времени впервые использован метод электрооптического мониторинга. Показана применимость данного метода для изучения всех штаммов туляремийного микроба, независимо от подвидовой принадлежности, в диапазоне показателя анизотропии поляризуемости от 80 до 200 усл. ед. при частоте исследования бактериальной культуры 900 кГц и 2100 кГц.

Проведение сравнительного анализа степени воздействия стресс-условий на клетки *F. tularensis* позволило оптимизировать условия культивирования штамма-продуцента и разработать способ получения секретируемых стресс-белков. Впервые выделены и охарактеризованы антигены HSP, GroEl/GroEs и Bfr вакцинного штамма туляремийного микроба. Полученные белки имели следующие молекулярные массы: Bfr – 17 кДа, GroEl/GroEs – 57/10 кДа. Антигенный комплекс HSP имел в своем составе 5 мажорных полос с молекулярными массами от 10 до 90 кДа. Установлено, что все они являются видоспецифичными и регистрируются у *F. tularensis* независимо от подвидовой принадлежности штаммов. Приоритетность работы в данном направлении подтверждена патентом на изобретение №2830065 «Способ получения секретируемых стресс-белков *Francisella tularensis*».

Впервые установлена высокая протективная эффективность антигенов Bfr, GroEl/GroEs и HSP, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis*, на модели экспериментальной туляремийной инфекции у белых мышей. Иммунизация животных любым из исследуемых белков достоверно ($p < 0,05$) увеличивала продолжительность жизни и обеспечивала выживаемость более 50% особей, тогда как в контрольной группе, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840, наблюдалась 100 % летальность на 6-8 сутки.

В ходе исследования впервые разработан комплексный методический подход, позволяющий проводить многоуровневую оценку воздействия стрессовых факторов на клетки *F. tularensis* и включающий электрооптический анализ для оценки изменений на популяционном и клеточном уровнях, ИФА для изучения субклеточных процессов, а также ПЦР для оценки уровня экспрессии генов-регуляторов стресс-ответа. Данные методы позволяют не только оценивать жизнеспособность бактериальной культуры и воздействие факторов среды на клеточные структуры, но и проводить количественный анализ секреции стресс-белков (Bfr, GroEl/GroEs, HSP) для их последующей очистки и характеристики.

Теоретическая значимость

Теоретический аспект связан с комплексным исследованием физиологического состояния *F. tularensis* на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях при воздействии на микроорганизм различных стресс-факторов. Полученные данные вносят значительный вклад в определение закономерностей зависимости секреции стресс-белков от определенных условий и будут использованы для получения протективных антигенов туляремийного микроба. Изложенные в диссертации результаты служат теоретической основой для исследований, целью которых является изучение адаптационных механизмов возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Разработанный комплексный подход имеет важное значение для фундаментальных исследований механизмов бактериальной адаптации, а также для практических аспектов лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики туляремии, объединяя теоретические и прикладные подходы изучения стресс-ответа патогенных микроорганизмов. Полученные результаты создают основу для разработки новых диагностических систем и усовершенствования существующих методов профилактики этого опасного заболевания.

Практическая значимость

Разработанные праймеры и зонды к генам стресс-ответа *F. tularensis* (*bfr, groEl, rpoH*) позволяют количественно оценить их экспрессию методами ОТ-ПЦР и цкПЦР. Установлена высокая чувствительность методов при изучении различных подвидов туляремийного микроба: до 10^4 м.к./мл для ОТ-ПЦР и до 10^1 м.к./мл для цкПЦР.

Использование электрооптического анализа обеспечивает оперативный мониторинг физиологического состояния бактериальной культуры в режиме реального времени, включая условия глубинного культивирования. Результаты экспериментальной работы использованы при разработке базы данных «Система протоколирования и анализа результатов процесса аппаратного глубинного культивирования бактерий» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных

№ 2023622431, заявл. 03.07.2023, опубл. 17.07.2023. Бюл. №7).

Полученные новые данные об экскретируемых антигенах включены в созданную базу данных «Биотехнологически значимые антигены возбудителей особо опасных инфекций» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных RU2025622621, заявл. 21.02.2025, опубл. 18.06.2025. Бюл. №6), что расширило её информационную ценность для разработки диагностических и профилактических препаратов.

В ходе работы впервые разработаны и успешно апробированы схемы иммунизации кроликов, включающие использование наночастиц коллоидного золота и хитозана (Cs) в качестве адъювантов для антигенов. Данные схемы позволили получить поликлональные сыворотки, обладающие специфичностью и широким спектром узнавания в отношении *F. tularensis* разных подвидов.

Экспериментально обоснованы условия длительного хранения рабочей культуры вакцинного штамма туляремийного микроба (до 2-х лет), обеспечивающие сохранение показателя остаточной вирулентности в диапазоне 10^2–10^6 микробных клеток, что соответствует требованиям нормативного документа МУ 3.3.1.2161-07 «Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба». Проведенные исследования показали, что криоконсервация является оптимальным методом хранения рабочей культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в течение длительного времени без изменения его свойств.

Разработаны следующие методические рекомендации учрежденческого уровня внедрения:

1. «Электрооптический мониторинг жизнеспособности вакцинного штамма туляремийного микроба» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 3 от 05.11.2020).

2. «Получение экскретируемых стресс-белков *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 4 от 23.06.2022).

Методология и методы исследования

Основными объектами исследования были штаммы *F. tularensis* подвидов *holarctica, tularensis, mediasiatica, novicida*, а также антигены вакцинного штамма туляремийного микроба – HSP, Bfr, GroEl/GroEs. Предметом исследования явились методы *in vitro* для контроля специфической активности антигенов туляремийного микроба и контроля ответа на стресс-условия у штаммов *F. tularensis*. Теоретической базой работы явились исследования российских и зарубежных ученых. При выполнении работы применяли микробиологические, биотехнологические, биологические, биофизические, иммунохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны специфические наборы олигонуклеотидных праймеров и зондов к консервативным участкам стресс-генов *bfr*, *groEl* и *rpoH*, позволяющие количественно оценивать их уровень экспрессии у различных подвидов *F. tularensis* методом ПЦР в реальном времени с высокой аналитической чувствительностью и специфичностью.

2. Применение метода электрооптического анализа позволяет в режиме реального времени определять физиологическое состояние клеток туляремийного микроба при взаимодействии со стресс-факторами.

3. Секретируемые стресс-белки *F. tularensis* (HSP, GroEl/GroEs, Bfr) способны индуцировать специфический иммунный ответ, обеспечивают эффективную защиту биологических моделей от экспериментальной туляремийной инфекции. Белки GroEl/GroEs и HSP позволяют детектировать специфические антитела в сыворотках крови вакцинированных и переболевших животных. Полученные поликлональные антисыворотки позволяют достоверно детектировать штаммы *F. tularensis* разных подвидов (*tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica*, *novicida*) в биологических образцах.

4. Комплексный методический подход к исследованию функционального состояния клеток *F. tularensis* обеспечивает всестороннюю оценку влияния стресс-

факторов (температурный стресс, перекисное окисление, длительное хранение, антибактериальные препараты) на патоген, дополняет способы изучения механизмов взаимодействия возбудителя туляремии с клетками макроорганизма.

Степень достоверности

Достоверность работы основана на значительном объеме экспериментов и полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке, соответствии теоретическим данным, применении современных актуальных методов исследования, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проведены с использованием сертифицированного оборудования и средств измерений, прошедших метрологическую поверку.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены и обсуждались на V Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2018); IV Всероссийском семинаре памяти профессора Ю.П. Волкова (Саратов, 2018); XI Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» СГУ имени Н.Г. Чернышевского (Саратов, 2019); XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов-на-Дону, 2020); Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Л.Ф. Зыкина (Саратов, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 2021); конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность–2022» (Москва, 2022); ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2018–2022). V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь,

2024); III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Байкальск, 2024).

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в разработке концепции исследования, постановке цели и задач, планировании и проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке научных публикаций и методических рекомендаций.

Некоторые экспериментальные исследования проведены совместно с сотрудниками других отделов: к.б.н. Кузнецовым О.С. (атомно-силовая микроскопия); к.м.н. Тучковым И.В. (подбор праймеров и зондов); Степановым А.В. (синтез праймеров и зон-дов); д.б.н. Кравцовым А.Л. (цитофлуориметрические исследования), к.х.н. Красновым Я.М. (полногеномное секвенирование штаммов туляремийного микроба).

Автор выражает благодарность сотрудникам отделов профилактических препаратов, микробиологии, иммунологии, диагностических препаратов, питательных сред, экспериментальных животных с виварием ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора за консультативно-методическую помощь при выполнении отдельных этапов диссертационной работы.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в лаборатории холерных вакцин отдела профилактических препаратов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в период с 2018 по 2025 гг. в рамках отраслевых НИР: 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер гос-

регистрации АААА-А20-120012090035-1); 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Публикация научных трудов

По материалам диссертационной работы опубликовано 20 научных работ, включая 1 патент на изобретение, 2 свидетельства о регистрации баз данных, 9 статей, 7 из которых включены в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России».

Структура диссертации

Диссертация представлена на 151 странице и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 28 таблицами и 20 рисунками. Библиографический список содержит 234 источника.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Способы оценки влияния внешних факторов на физиологическое состояние бактериальной клетки: адаптация методов, диапазон применимости

Исследование влияния внешних факторов на бактериальные клетки является ключевым для понимания физиологии микроорганизмов, их функциональной активности и взаимодействия с окружающей средой. Получаемые данные имеют фундаментальное и прикладное значение для медицины, сельского хозяйства, экологии и биотехнологии, способствуют разработке новых методов противодействия патогенам и минимизации негативного влияния антибиотиков на нормальную микробиоту человека и животных [Maier L. et al., 2021]. Анализ взаимодействий между макро- и микроорганизмами в экосистемах позволяет прогнозировать и предотвращать экологические кризисы [Renoud S. et al., 2022]. А выявление условий, стимулирующих рост и размножение бактерий, крайне важно для оптимизации биосинтеза ценных соединений и других биотехнологических процессов [Kanno M. et al., 2015; Juntachai W. et al., 2020].

Влияние стрессовых факторов на бактериальную клетку отражается на разных уровнях ее организации: популяционном, клеточном, субклеточном и молекулярном. Для отражения как групповых, так и индивидуальных характеристик микроорганизмов на каждом из этих уровней, применяются различные методы исследования, позволяющие показать наиболее полную картину происходящих изменений. В этом разделе представлен анализ данных литературы о существующих методических подходах к изучению физиологического состояния бактериальных клеток. В таблице 1 представлено краткое описание методов, более подробный анализ которых, основанный на литературных данных, изложен далее.

Таблица 1 – Методы изучения бактериальных клеток

Уровень исследования	Метод	Преимущества	Недостатки
Популяционный	Бактериологический	- возможность выделения чистой культуры возбудителя - чувствительность метода - возможность определения видовой принадлежности возбудителя, его чувствительность к антибиотикам и т.д.	- не все микроорганизмы имеют культивируемые формы длительный рост (до 10 суток) - дороговизна питательных сред
	Спектроскопические методы	- нет прямого взаимодействия прибора и бактериальной взвеси - не требует дополнительных реагентов	- дает только примерную оценку концентрации микроорганизмов в взвеси - не способен измерять слишком низкие концентрации
Клеточный	Электрооптический анализ	- исследование возможно проводить в режиме реального времени - не требует специальной пробоподготовки - возможность изучения нативной культуры - способен определять взаимодействие между клеткой и бактериофагами	- не способен определять малые концентрации микроорганизмов в суспензии
	Квантовые точки	- широкий спектр флуоресценции – возможно оценивать сразу несколько видов микроорганизмов в смесях - высокая биосовместимость	- сложность синтеза
	Проточная цитометрия	- может обрабатывать сразу большое количество клеток - анализ каждой отдельной клетки	- специфичная и трудоемкая пробоподготовка

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4
Клеточный	Электронная микроскопия	- высокая разрешающая способность - возможность исследования клеточных структур	- дорогостоящее оборудование - необходимость в пробоподготовке - невозможность исследования живых клеток
	Атомно-силовая микроскопия	- высокая разрешающая способность - возможность анализа характеристики поверхностных свойств клетки - шероховатость, адгезивность - пробоподготовка проста в исполнении	- небольшое поле сканирования - невозможность исследования живых клеток
Молекулярный	Полимеразная цепная реакция	- высокая чувствительность и достоверность - короткий срок выполнения анализа - возможность количественной оценки продукта	- требуется специальная пробоподготовка
	Протеомика и метаболомика	- способность определения качественного и количественного состава протеома микроорганизма - высокая точность исследования	- длительная пробоподготовка - ограниченный диапазон обнаружения - требуется дорогостоящее оборудование

Популяционный уровень

В микробиологии под бактериальной популяцией понимают совокупность микроорганизмов одного вида, занимающих определенный биотоп и способных к взаимодействию между собой. Одним из ключевых параметров ее физиологического состояния является способность клеток расти и размножаться. Для оценки степени воздействия внешних факторов на популяцию клеток повсеместно используется метод культивирования на поверхности питательного агара. Данный способ прост в работе и уже долгое время носит статус «золотого стандарта»

[Postgate J.R., 1969; Hattori T., 1988]. Тем не менее, несмотря на его широкое применение, данный метод не может считаться универсальным. Согласно литературным данным, 95 % всех культивируемых и описанных в научных публикациях бактериальных видов принадлежат лишь к 5 из 53 общепризнанных типов бактерий [Keller M. et al., 2004]. Кроме того, многие микроорганизмы могут находиться в некультивируемой форме, или в состоянии стресса, сохраняя метаболическую активность, но не образуя колоний на питательных средах [Postgate J.R., 1967; Wayne L.G., 1994; Dedysh S.N. et al., 2023].

Спектроскопические методы представляют собой важный инструмент косвенной оценки жизнеспособности бактериальных популяций в жидких питательных средах. Эти подходы позволяют количественно определять как плотность клеточной суспензии, так и концентрацию различных метаболитов (белков, нуклеиновых кислот и других соединений) в культуральной жидкости [Beutel S. et al., 2011; Leme J. et al., 2014]. Принцип метода основан на способности бактериальных суспензий изменять оптические свойства среды, что дает возможность оценивать концентрацию культуры по показателям оптической плотности. Динамика изменения этого параметра может служить индикатором жизнеспособности популяции.

Спектроскопический анализ может проводиться как в видимой области спектра, так и в ультрафиолетовом диапазоне (100–315 нм), что позволяет адаптировать методику под конкретные исследовательские задачи. Ключевыми преимуществами этих методов являются их неинвазивность и отсутствие необходимости использования дополнительных реагентов [Ulber R. et al., 2003]. Тем не менее, эти методы не обеспечивают высокой точности из-за существенной зависимости результатов от условий культивирования, включая оптические характеристики среды, вариабельность показаний между приборами и нелинейный характер зависимости между оптической плотностью и концентрацией микроорганизмов [Myers J.A. et al., 2013]. Эти особенности необходимо учитывать при использовании спектроскопических методов в микробиологических исследованиях, особенно при

работе с требовательными к условиям культивирования микроорганизмами, такими как *F. tularensis*.

Клеточный уровень

Для изучения ответа бактерий на стресс немаловажную роль играют изменения морфологии клеток. В этом плане активно используются микроскопические методы исследования. Так, атомно-силовая микроскопия (АСМ) применяется для детального анализа рельефа клеточной поверхности, картирования рецепторов, а также оценки силы, динамики взаимодействия с лигандами, эластичности и адгезивности бактериальных ворсинок [Alsteens D. et al., 2017; Nievergelt A.P. et al., 2018]. Этот метод позволяет не только визуализировать изменения ультраструктуры клетки под действием противомикробных соединений, но и дифференцировать прямые эффекты препаратов от косвенных клеточных реакций на стресс [Ерохин П.С. и др., 2015; Dufrêne Y.F. et al., 2021].

Одним из наиболее передовых и эффективных методов исследования микроструктуры бактериальных клеток является электронная микроскопия. Многие авторы используют данный метод для изучения влияния на клетки низких температур, сфинголипидов, а также образование бактериальных биопленок в ответ на воздействие стресс-факторов [Болотский М.Н. и др., 2007; López D. et al., 2010; Peters S. et al., 2021].

Современные исследования структурной целостности и жизнеспособности бактериальных клеток сочетают микроскопические методы с применением флуоресцентных маркеров жизнеспособности. Согласно литературным данным, использование таких красителей как тетразолий, реазурин, AlamarBlue, SYTO 9 и пропидий йодид позволяет эффективно дифференцировать живые и мертвые клетки по их оптическим характеристикам [Еремеев А.В. и др., 2023; Wang M. et al., 2022]. Этот подход характеризуется не только высокой пропускной способностью анализа, но и способностью детектировать некультивируемые формы микроорганизмов, сохранившие жизнеспособность после стрессовых воздействий, таких как лиофилизация и длительное хранение [Vriezen J.C. et al., 2012].

Особую точность и информативность исследованиям придает метод проточной цитометрии, который обеспечивает мультипараметрическую оценку бактериальной популяции [Nebe-von-Caron G. et al., 2000; Ibrahim S.F. et al., 2007]. Данная технология позволяет комплексно оценивать физиологическое состояние микроорганизмов по трем ключевым параметрам: уровень метаболической активности, содержание нуклеиновых кислот и проницаемость клеточных мембран. Как отмечают специалисты, принципиальным преимуществом проточной цитометрии является возможность индивидуального анализа каждой клетки с исключительной быстротой и точностью дифференциации живых и мертвых [Müller S. et al., 2009; Kramer B. et al., 2014].

Квантовые точки – перспективные флуоресцентные наноматериалы, отличающиеся высокой яркостью, устойчивостью к фотообесцвечиванию и способностью к селективному взаимодействию с биологическими макромолекулами. Благодаря уникальным оптическим свойствам, квантовые точки активно используются в биотехнологических исследованиях для многопараметрического анализа, включая сверхчувствительное детектирование, одновременную визуализацию множества мишеней и комплексное изучение молекулярных взаимодействий. [Chan W.C. et al., 2002]. Так, например, конъюгаты антител или олигонуклеотидов с квантовыми точками различной эмиссионной характеристики позволяют проводить мультиплексную идентификацию микроорганизмов в сложных субстратах, включая клеточные культуры и клинические образцы биологического происхождения [Ali M.M. et al., 2019; Khoris I.M. et al., 2020; Melike S. et. al, 2023].

Еще одним из перспективных направлений изучения жизнеспособности клеток является электрооптический анализ, основанный на регистрации изменений электропроводности и диэлектрической проницаемости клеточных мембран [Гулий О.И., 2006]. Метод демонстрирует значительный прикладной потенциал: он позволяет оценивать ферментативную активность микробных клеток, детектировать взаимодействия бактерии с бактериофагами, анализировать чувствительность к антимикробным препаратам и определять токсичные субстраты. [Иванов

А.Ю. и др., 1985; Гулий О.И. и др., 2010; Гулий О.И. и др., 2016; Ignatov O.V. et al., 2004]. С его помощью возможно оценивать динамику количества интактных клеток при экстремальных воздействиях (обработка толуолом, этанолом, термический шок) с точностью определения доли неповрежденных клеток 3–5%. При этом показано, что электрооптический анализ позволяет дифференцировать клетки с летальными и сублетальными повреждениями. [Игнатов С.Г. и др., 2007].

Молекулярный уровень

Изучение бактериальной клетки на молекулярном уровне, включающее анализ структурных особенностей, взаимодействий и функций биологических макромолекул (белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты), обеспечивает глубокое понимание клеточных регуляторных механизмов, метаболических процессов и патогенетических особенностей микроорганизмов.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет изучать стресс у микроорганизмов на молекулярном уровне посредством анализа изменений экспрессии стресс-регулирующих генов [Chia J.S. et al., 2001; Bonomo M.G. et al., 2009]. Наиболее информативными мишенями для такого анализа служат гены, кодирующие стресс-белки и регуляторные элементы метаболизма [Arunima A. et al., 2020; Feliciello I. et al., 2022].

Современной альтернативой классическим методам ПЦР служит «ПЦР жизнеспособности» (Viability PCR, vPCR), основанный на дифференциальном проникновении интеркалирующих ДНК-красителей через мембраны живых и мертвых клеток [Bae S. et al., 2009; Chiang E.L.C. et al., 2022]. При инкубации с моноазидом пропидия (PMA) и последующей фотоактивацией происходит необратимое связывание красителя с ДНК нежизнеспособных клеток, что блокирует ее амплификацию. В отличие от них, интактные клетки остаются непроницаемыми для реагента, что позволяет детектировать исключительно жизнеспособные микроорганизмы в количественной ПЦР [Cangelosi G.A. et al., 2014; Lee S. et al., 2018; Chiang E.L.C. et al., 2022].

Еще одним перспективным молекулярно-генетическим направлением в об-

ласти изучения стресса у микроорганизмов является транскриптомика и протеомика. Транскриптомный анализ служит инструментом для определения локализации стартовых сайтов транскрипции и количественного измерения уровня транскриптов в разных физиологических состояниях клетки, включая ее развитие и стресс. В отличие от стабильного генома, транскриптом динамически изменяется в ответ на внешние воздействия, отражая текущий профиль экспрессии генов. Транскриптомный анализ также позволяет исследовать гены немедленного и раннего ответа (immediate-early genes), экспрессия которых активируется непосредственно после воздействия индуктора ещё до изменения содержания белковых продуктов вследствие низкой скорости трансляции [Ritchie M.D. et al., 2015]. Благодаря этому методу показано, что изменение диеты у лабораторных животных вызывает перестройку метаболических путей микобиоты, что нарушает целостность кишечного барьера организма-хозяина. Транскриптомный анализ также даёт возможность оценить взаимосвязь между стрессовым воздействием на бактериальную клетку и последующими изменениями её антибиотикорезистентности [Leshchiner D. et al., 2022; Kim K.S. et al., 2023].

Методы протеомного анализа применяются для исследования структурно-функциональных изменений бактериальных белков и пептидов, возникающих при взаимодействии с макроорганизмом или биологически активными веществами. Данный подход позволяет решать широкий спектр задач, включая идентификацию маркеров инфекционных заболеваний, поиск перспективных белковых антигенов для вакцин, изучение механизмов патогенности и анализ влияния различных факторов на экспрессию белков в системе «макроорганизм-микроорганизм» [Шаров Т.Н. и др., 2023]. Особый научный интерес представляет качественное и количественное определение антиоксидантных белков, экспрессия которых индуцируется в процессе взаимодействия между микроорганизмами и различными формами макроорганизмов (растения, животные, человек). [Zhang Y. et al., 2015; Mahajan G. et al., 2017; Jain A. et al., 2021].

Анализ бактериального протеома в большинстве исследований основан на

методах электрофореза (одномерного и двумерного) [Chandrasekhar K. et al., 2014; Šrajer G.M. et al., 2017] или жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) [Vranakis I. et al., 2012]. Однако эти подходы требуют длительной пробоподготовки и обладают ограниченным диапазоном детекции (10–200 кДа) [Hemm M.R. et al., 2010]. Перспективной альтернативой выступает масс-спектрометрия MALDI-TOF-MS, которая обеспечивает надежную идентификацию изменений протеома при минимальной подготовке образцов [Intelicato-Young J. et al., 2013] и успешно применяется для комплексного изучения протеомного ответа на стрессовые воздействия [Schott A.S. et al., 2016].

Метаболомный анализ представляет собой перспективный метод исследования полного набора метаболитов бактериальной клетки, отражающий активность её ферментативных систем и взаимодействие с окружающей средой. Этот подход позволяет получить интегральную оценку физиологического состояния микроорганизма, демонстрируя высокую чувствительность к различным внешним воздействиям [Reese K.L. et al., 2020].

Исследование стресс-реакций бактерий играет ключевую роль в понимании их адаптационных механизмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Современные методы изучения этих процессов охватывают различные уровни организации бактериальной клетки, позволяя получать комплексные данные о механизмах стресс-ответа. Оптические и бактериологические методы дают возможность оценить усредненную реакцию бактериальной популяции на стрессоры, однако не обеспечивают детализированной информации на уровне отдельных клеток. Более точные результаты позволяют получить методы исследования индивидуальных клеток, такие как атомно-силовая микроскопия, электрооптический анализ и электронная микроскопия, которые характеризуются высокой чувствительностью и разрешающей способностью. Эти подходы дают ценную информацию о морфологических изменениях клеток, включая деформацию клеточной стенки и изменения размеров, а также о физико-химических свойствах их поверхности.

Современные молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование

ДНК) играют ключевую роль в исследовании стресс-реакций, обеспечивая комплексный анализ: от изменений экспрессии генов и структуры ДНК до транскриптомного ремоделирования на уровне популяции и отдельных клеток. Дополняют эти данные протеомные технологии, такие как двумерный электрофорез и масс-спектрометрия, обеспечивающие количественную оценку изменений в белковом профиле и идентификацию ключевых белков стресс-ответа, включая шапероны.

Комплексное применение современных методов исследования позволяет получить многоуровневое понимание адаптационных механизмов бактерий, выявить корреляции между генетическими, протеомными и фенотипическими изменениями, а также повысить точность прогнозирования поведения микроорганизмов в стрессовых условиях. Такой подход открывает новые перспективы в изучении бактериального стресс-ответа, что имеет важное значение для разработки новых методов профилактики и диагностики бактериальных инфекций.

1.2 Структурная, функциональная, иммунобиологическая характеристика бактериальных стресс-белков и их прикладной потенциал

Адаптация микроорганизмов к стрессовым условиям представляет собой сложный многоуровневый процесс, включающий каскад регуляторных реакций. Ключевую роль в этом процессе играют специализированные гены-контроллеры, активация которых обеспечивает клеточный гомеостаз и выживаемость в неблагоприятных условиях. Молекулярные исследования демонстрируют, что экспрессия этих генов приводит к значительному увеличению синтеза стресс-белков, выполняющих защитные функции. Важно отметить, что предварительное воздействие сублетальными дозами стрессоров может индуцировать развитие устойчивости к более интенсивным повреждающим факторам, что свидетельствует о существовании сложных механизмов стресс-адаптации на клеточном уровне [Battesti A. et al., 2011].

Универсальные стресс-белки (universal stress proteins, USP) существуют у всех видов микроорганизмов и являются важными регуляторными детерминанта-

ми, которые жизненно важны для выживания в стрессовых условиях [Havis S. et al., 2019; Luo D. et al., 2023]. USP выполняют различные функции в бактериях, такие как: гидролиз АТФ [Iino H. et al., 2011], изменение свойств мембраны в ответ на окислительный стресс [Averaimo S. et al., 2010] и воздействие Cl_2 [Suh K.S. et al., 2004]. Известно, что *Mycobacterium tuberculosis* экспрессирует около 10 различных стресс-белков, чтобы выжить при увеличении уровня CO_2 [O'Toole R. et al., 2003].

Впервые USP были обнаружены у *Escherichia coli* [Nyström T. et al., 1992], а в дальнейшем и у других видов микроорганизмов [Boes N. et al., 2006]. Белки данного семейства разделяют на пять классов по их функциональной специализации: антиоксидантная защита, гомеостаз железа, контроль клеточной агрегации, регуляция подвижности и участие в адгезивных взаимодействиях [Nachin L. et al., 2005]. Помимо этого, у некоторых микроорганизмов эти белки отвечают за образование биопленок [Galindo Blaha C.A. et al., 2003], а также за вирулентность [Elhosseiny N.M. et al., 2015].

Несмотря на функциональное разнообразие этих белков, они характеризуются общими структурными элементами – наличием нескольких параллельных β-складок и АТФ-связывающих доменов. Их локализация не ограничивается клеточной мембраной: USP могут располагаться и в других компартментах бактериальной клетки [Zarembinski T.I. et al., 1998].

USP, благодаря своей уникальной способности реагировать на широкий спектр стресс-условий стали многообещающими кандидатами для различных областей применения в биотехнологии. Модифицированные микроорганизмы со сверхэкспрессией USP обладают повышенной устойчивостью к высоким температурам и токсичным химическим веществам [Nabi B. et al., 2024]. Модифицированные бактериальные USP также выполняют функцию биосенсоров для оценки уровня экологического стресса и обеспечивают возможность мониторинга промышленных процессов в режиме реального времени [Bandyopadhyay D. et al., 2021].

Белки теплового шока (heat stress proteins, HSPs) являются наиболее изученными стресс-белками как у животных, так и у микроорганизмов [Ritossa F. et al., 1996] и синтезируются в ответ на повышение температуры окружающей среды. Регулятором белков теплового шока у большинства микроорганизмов является сигма-фактор sigma-32 (σ^{32}), впервые обнаруженный у *E. coli* [Grossman A.D. et al., 1984]. Также, у *E. coli* обнаружен иной регулятор теплового шока SiGe. Оба фактора являются цитозольными белками и присутствуют в клетке в нормальных условиях, но имеют различные пути активации. Так, σ^{32} активируется денатурированными белками, появляющимися в цитоплазме после термостресса (от 30 до 42 °C), а SiGe активируется при тех же условиях развернутыми белками в периплазме [Schumann W. et al., 2016]. Несмотря на то, что основную часть белков, секретируемых при тепловом шоке, составляют молекулы массой 65–70 кДа, протеомный анализ выявляет также дополнительные компоненты с иными молекулярными массами [Баснакьян И.А., 2003]. У *F. tularensis* σ^{32} регулирует экспрессию генов, кодирующих белки HSP_{40}, GroEl, GroEs, DnaK, DnaJ, GrpE, ClpB, ClpX, ClpP и HtpG. Показано, что избыточная экспрессия данного регулятора приводит к двукратному увеличению синтеза шаперонных белков в ответ на тепловой стресс [Grall N. et al., 2009].

Выделенные из клеток очищенные HSPs являются антигенами для иммунной системы лабораторных животных и человека и могут быть применены в качестве компонентов для диагностики заболеваний [Hoffman P.S. et al., 1990; Ericsson M. et al., 1994; Srivastava S.K. et al., 2013].

Белки окислительного стресса

Окислительный стресс подразумевает образование активных форм кислорода, таких как супероксидный анион (O_2^-), синглетный кислород ($^1O_2$), гидроксильные радикалы (OH^-) и пероксид водорода (H_2O_2), которые образуются в клетках в результате взаимодействия с условиями окружающей среды и, повреждая ДНК бактерий, индуцируют мутагенез [Ezraty B. et al., 2017]. В ответ на окислительный стресс бактериальные клетки активируют комплексную антиоксидантную защиту,

представленную взаимосвязанными редокс-системами (тиоредоксинредуктазной, глутаредоксиновой и пероксиредоксиновой), функционирующими как единый механизм детоксикации активных форм кислорода [Maqbool I. et al., 2020].

Основными регуляторами транскрипции окислительного стресса выступают белки OxyR, SoxRS, PerR, UspA, SsrB, MarA, OhrR и SarZ, которые детектируют изменения и координируют антиоксидантный ответ. Ответная реакция включает в себя экспрессию ферментативных (супероксиддисмутаза – SOD, каталаза – katA, глутатионпероксидаза – GPx, глутатионредуктаза – GR) и неферментативных (тиоредоксин – Trx, глутаредоксин, пероксиредоксин – Prx) компонентов антиоксидантной системы. Экстремофильные микроорганизмы, такие как радиорезистентный *Deinococcus radiodurans*, имеют дополнительно усиленную каротиноидами и марганецсодержащими комплексами систему [Maqbool I. et al., 2020; Qi H. et al., 2020].

Патогенные микроорганизмы способны выживать при взаимодействии с иммунными клетками хозяина благодаря системе белков, обеспечивающих защиту от окислительного стресса [Sato Y. et al., 2019]. Например, *Staphylococcus aureus, Francisella tularensis* и *Acinetobacter baumannii,* экспрессируя белки окислительного стресса, такие как SodB и KatG, защищаются от активных форм кислорода (АФК) и способны выживать в фаголизосомах хозяина [Elhosseiny N.M. et al., 2015; Uribe-Quero E. et al., 2017; Marghani D., et al., 2021].

Бактериальные белки окислительного стресса, такие как каталаза и супероксиддисмутаза, благодаря выраженной ферментативной активности используются в диагностических и аналитических целях [Kauldhar B.S. et al., 2016]. Помимо этого, данные ферменты могут применяться в качестве целей для новых методов антимикробной тепапии [Surur A.K. et al., 2025].

Стресс, связанный с ограничением питательного субстрата

В естественной среде обитания микроорганизмы часто обладают ограниченным количеством питательного субстрата, например источника азота, фосфора, железа, углерода, необходимых для их жизнедеятельности. Обычно это связано

с конкурентной борьбой за ресурс при высокой плотности популяции, а также со сменой среды обитания, например, при столкновении с иммунной системой организма-хозяина [Arunima A. et al., 2020].

В условиях дефицита питательных веществ микроорганизмы активируют систему строгого ответа (stringent response), что приводит к замедлению клеточной репликации, снижению синтеза рибосомальных и транспортных РНК, усилению экспрессии стресс-генов и оптимизации распределения ограниченных ресурсов для энергосбережения и выживания в период голодания [Steinchen W. et al., 2020]. Данный механизм активируется образованием сигнальной молекулы – гуанозинпентафосфата (pppGpp), синтезируемого белком Rel [Irving S.E. et al., 2018]. Установлено, что активация строгого ответа повышает устойчивость бактерий к действию антибиотиков и другим стрессовым воздействиям [Pacios O. et al., 2020].

Таким образом, исследование биосинтеза и функциональных свойств бактериальных стресс-белков раскрывает ключевые механизмы адаптационных сигнальных каскадов, обеспечивающих выживание патогенов в изменяющихся условиях среды и при взаимодействии с организмом хозяина. Эти данные имеют важное значение, как для фундаментального понимания бактериальной физиологии, так и для разработки стратегий контроля инфекционных заболеваний.

1.3 Факторы адаптации *F. tularensis*

Таксономически возбудитель туляремии *Francisella tularensis* (тип *Pseudomonadota*, класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Thiotrichales*, семейство *Francisellaceae*, род *Francisella*) включает четыре подвида (subspecies, ssp): *tularensis* (тип A), *holarctica* (тип B), *mediasiatica* и *novicida* [«List of Procariotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)», http://www.bacterio.net/francisella.html – дата обращения 04.06.2025г.]. Каждый подвид возбудителя туляремии имеет географическую приуроченность: *F. tularensis* ssp. *tularensis* распространен в США, [Sammak R.L. et al., 2013],

F. tularensis ssp. *holarctica* – в Европе [Олсуфьев Н.Г. и др., 1982], *F. tularensis* ssp. *mediasiatica* – в некоторых районах Казахстана и Узбекистана [Mörner T. et al. 1992]. *F. tularensis* subsp. *novicida* распространена в Северной Америке и Австралии, однако единичные случаи инфицирования людей были зарегистрированы в Италии, на Тайване и в Таиланде [Rigamonti S. et al., 2024]. На территории Российской Федерации выделяют и идентифицируют преимущественно *F. tularensis* подвидов *holarctica* и *mediasiatica* [Осина Н.А. и др., 2005; Павлов В.М. и др., 2015].

Широкое распространение возбудителя туляремии в различных географических и климатических регионах определяет наличие у *F. tularensis* множества экологических резервуаров. Патоген циркулирует среди широкого спектра хозяев, включая хладнокровных (насекомые, членистоногие, пресноводные простейшие) и теплокровных (грызуны и другие млекопитающие, человек) [Попова А.Ю. и др., 2016; Hennebique A. et al., 2021]. При отсутствии подходящего хозяина бактерия способна длительно сохраняться в окружающей среде в некультивируемом состоянии с минимальной репликативной активностью, однако при попадании в восприимчивый организм быстро трансформируется в вегетативные вирулентные формы [Thelaus J. et al., 2014; Telford S.R. et al., 2020]. Ревертанты некультивируемых форм восстанавливают все свои свойства, включая вирулентность [Романова Л.В. и др., 2000].

При проникновении в макроорганизм, *F. tularensis* индуцирует систему адаптационных механизмов, направленных на противодействие иммунной защите хозяина и обеспечение выживания в условиях внутриклеточной среды. [Sjöstedt A. et al., 2003].

Липополисахарид (ЛПС) – структурный компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, который служит ключевым иммуностимулирующим агентом благодаря высокой аффинности к рецепторам иммунной системы хозяина [Trent M.S. et al., 2006]. ЛПС туляремийного микроба, в отличие от других грамотрицательных бактерий, имеет особую структуру и

состоит из липида А, основного олигосахарида (3-дезокси-D-манно-октулозоновая кислота) и О-полисахарида (О-антиген), который содержит различное количество повторяющихся звеньев тетрасахарида. По литературным данным, именно эта особая структура обеспечивает ЛПС *F. tularensis* полное отсутствие токсичности для чувствительных животных [Ancuta P. et al., 1996].

Один из компонентов ЛПС *F. tularensis*, липид А, не способен действовать как антагонист врожденных иммунных реакций, опосредованных TLR4 человека или мыши и неспособен связываться с TLR4 или другими компонентами комплекса рецепторов к ЛПС, что приводит к неспособности инициировать врожденный иммунный ответ. [Okan N.A. et al., 2013].

О-антиген туляремийного микроба представляет собой уникальный участок молекулы на поверхности клетки. Предполагается, что данный антиген служит ключевым индуктором высокоспецифичных антител, в отличие от иммуноглобулинов, направленных против коровых эпитопов, которые демонстрируют перекрёстную реактивность [Оноприенко Н.Н., 2001]. Потеря О-антигена снижает вирулентность *F. tularensis* для мышей, однако антитела, индуцированные атипичным штаммом, обеспечивают перекрёстную защиту против других вакцинных штаммов [Мокриевич А.Н. и др., 2010]. Биосинтез О-антигена контролируется геном *wbtA*, делеция которого приводит к полному исчезновению О-антигена, повышению чувствительности к специфической сыворотке, нарушению внутриклеточной репликации и значительному снижению вирулентности для биомоделей. Однако заражение этим мутантом защищает от гибели чувствительных животных при инфицировании родительским штаммом *F. tularensis* LVS [Raynaud C. et al., 2007]. Таким образом, за счет низкой токсичности и высокой протективной активности, ЛПС туляремийного микроба играет существенную роль в патогенезе и иммуногенезе туляремии, что обуславливает возможность его использования для создания безопасных, эффективных и специфичных иммунопрофилактических и диагностических препаратов [Cowley S.C. et al., 2011].

Везикулы

Возбудитель туляремии обладает способностью к внутриклеточной репликации в различных типах клеток, преимущественно в макрофагах. Ключевым фактором его вирулентности является образование везикул внешней мембраны (outer membrane vesicles – OMV), позволяющих противостоять защитным механизмам макроорганизма. OMV представляют собой наноразмерные (20–300 нм) двумембранные структуры, формирующиеся путем отпочкования фрагментов внешней мембраны с периплазматическим содержимым [Haurat M. et al., 2015]. Эти везикулы функционируют как многофункциональные секреторные органеллы и опосредуют транспорт антигенов, способствующих бактериальной колонизации и диссеминации [Yoon H. et al., 2016]. Дискуссионным остается вопрос и о природе их биогенеза – являются ли они результатом неспецифического побочного процесса или это регулируемый механизм. Также недостаточно изучены принципы селективного включения вирулентных факторов в состав везикул. Установлено, что OMV *F. tularensis* обладают уникальной структурной организацией, отличающей их от аналогов у других бактерий. Они формируют нанотрубочки, содержащие факторы вирулентности и иммунореактивные белки [McCaig W.D. et al., 2013; Sampath V. et al., 2018]. Показано, что OMV активно секретируются клетками возбудителя в течение первого часа после фагоцитоза макрофагами, что подтверждает их роль как значимого фактора патогенности [Golovliov I. et al., 2003; Kilmury S.L.N. et al., 2011; McCaig W.D. et al., 2013]. Протеомный анализ выявил наличие в составе везикул до 520 различных антигенов и вирулентных факторов [Pierson T. et al., 2011].

OMV способны образовываться и вне клеток-хозяев. При переходе из экспоненциальной фазы роста в стационарную, клетки туляремийного микроба продуцируют везикулы, содержащие иной белковый профиль, нежели при росте в макрофагах [Pierson T. et al., 2011]. Так, OMV помогают защитить *F. tularensis* во время ее внеклеточной фазы, действуя как приманка для антимикробных пептидов и антител человека [Manning A.J. et al., 2011].

Таким образом, везикулы, за счет способности выходить в окружающую среду, являются перспективными кандидатами на роль компонентов туляремийной вакцины. Но, поскольку их состав сильно зависит от условий окружающей среды, возможность получения везикул с одинаковыми свойствами снижается.

Капсулоподобный комплекс (КПК)

Возбудитель туляремии способен синтезировать капсулоподобное вещество, выполняющее защитную функцию от действия биологических жидкостей, химических агентов и фагоцитоза [Мокриевич А.Н. и др., 2019; Bandara A.B. et al., 2011]. При инфицировании макрофагов, *F. tularensis* формирует капсулу толщиной 50–250 нм, которая редуцируется после выхода из фагосомы и не обнаруживается при внеклеточном росте [Cherwonogrodzky J.W. et al. 1994; Freudenberger Catanzaro K.C. et al., 2020]. Примечательно, что культивирование в сердечно-мозговом бульоне с добавлением глюкозы, галактозы или маннозы стимулирует синтез капсульного вещества, что повышает вирулентность штамма *F. tularensis* LVS *in vivo* [Bandara A.B. et al., 2011].

Капсулоподобный комплекс (КПК) возбудителя туляремии представляет собой гетерогенную структуру, состоящую из гликопротеинов, белков, везикул и трубочек [Freudenberger Catanzaro K.C. et al., 2020]. КПК возбудителя туляремии имеет атипичный состав, имея всего 10 % углеводов, таких как глюкоза, галактоза и манноза, тогда как основу составляют липиды (50–70 %), протеиназоустойчивые белки и высокомолекулярные гликопротеины (150–250 кДа) [Кузнецова Е.М. и др., 2009; Bandara A.B. et al., 2011]. Исследования демонстрируют различия в составе наружной мембраны у капсульных и бескапсульных вариантов *F. tularensis*: первые характеризуются наличием белка 65 кДа и S-ЛПС, вторые имеют белок 33 кДа и R-ЛПС [Geisbert T.W. et al., 1993; Cherwonogrodzky J.W. et al., 1994]. Наличие капсулоподобного вещества влияет на реактивность антительного ответа при вакцинации против туляремии [Sjöstedt A., 2003]. Генетический анализ выявил гомологию гена *capB F. tularensis* с геном капсульного синтеза *Bacillus anthracis*, ответственного за синтез поли-D-глутаминовой кислоты [Larsson P. et

al., 2005].

Стресс-белки

Важным компонентом *F. tularensis* являются белковые структуры, среди которых особый интерес представляют белки внешней мембраны. Эти молекулы играют ключевую роль во взаимодействии с клетками макроорганизма, выступая в качестве первичных мишеней для иммунного распознавания. Согласно экспериментальным данным, доля мембранных белков в поверхностных структурах бактериальной клетки варьирует в диапазоне от 12 до 20 %, причем их количественное содержание существенно зависит от условий культивирования штамма [Родионова, И.В. и др., 1990].

Функционирование белков у *F. tularensis* регулируется островом патогенности FPI (от англ. – pathogenicity island of *F. tularensis*) [Cuthbert B.J. et al., 2017], размером 30 т.п.н., который фланкирован транспозазами и ассоциирован с генами тРНК [Travis B.A. et al., 2021]. В составе FPI локализованы 4 открытые рамки считывания (ОРС, 2,5–3,9 т.п.н.), формирующие оперон *iglABCD,* который детерминирует способность возбудителя к внутриклеточной репликации и персистенции в макрофагах [Melillo A. et al., 2006]. Показано, что копийность данного оперона влияет на вирулентность туляремийного микроба. Так, вирулентные штаммы *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holarctica* (тип А) имеют 2 копии, а *F. tularensis* подвидов *mediasiatica* и *novicida* – 1 [De Bruin O.M. et al., 2007]. Ген *iglC* кодирует одноименный белок, массой 23 кДа, критически важный для персистенции возбудителя туляремии в макрофагах. Делеция этого гена приводит к значительному снижению вирулентности и утрате способности патогена выживать в иммунных клетках [Buchan B.W. et al., 2009].

Ключевым регулятором острова патогенности FPI выступает ген *mglAB*, обеспечивающий внутриклеточное выживание возбудителя туляремии в макрофагах [Charity J.C. et al., 2007]. Кодируемый им белок MglA, связываясь с другим белком – SspA (stringent starvation protein A), способен регулировать работу FPI в условиях голодания [Cuthbert B.J. et al., 2015]. Делеция *mglA* и *mglB* приводит к

неспособности туляремийного микроба реплицироваться в макрофагах и в целом, снижает его жизнеспособность [Baron G.S. et al., 1998].

На FPI расположен оперон *pdpABC* (pathogenicity determinant protein), кодирующий белки, необходимые для проявления вирулентности возбудителя [Nano F.E. et al., 2007]. Делеция наиболее крупного гена этого оперона *pdpA* (2,46 кб), ответственного за синтез одноименного белка, приводит к аттенуации штамма [Schmerk C.L. et al., 2009].

При фагоцитозе макрофаги инициируют окислительный взрыв для уничтожения бактериальных клеток. В ответ на накопление экзогенного H_2O_2, в цитоплазме *F. tularensis* активируется белок OxyR [Sen A. et al., 2021], который индуцирует транскрипцию 128 белков. Они функционально разделены на три группы: снижающие концентрацию H_2O_2, регулирующие поступление железа в клетку, и отвечающие за репарацию повреждений, вызванных H_2O_2. Для противодействия окислительному стрессу туляремийный микроб усиливает продукцию ключевых антиоксидантных ферментов – каталазы KatG, супероксиддисмутаз SodB и SodC и пероксидазы AhpC [Карцева А.С. И др., 2020; Alharbi A. et al., 2019] и активно экскретирует их во внеклеточную среду [Clemens D.L. et al., 2005]. Экспрессия этих антиоксидантных веществ активируется сразу после фагоцитоза и поддерживается на постоянном уровне как в фагосомальной, так и в цитозольной фазах инфекции, что свидетельствует о непрерывном окислительном стрессе на всех этапах внутриклеточного цикла [Wehrly T.D. et al., 2009]. Такая адаптационная стратегия позволяет возбудителю туляремии противостоять активным формам кислорода внутри клеток организма-хозяина и усиливать вирулентность для мышей [Binesse J. et al., 2015].

Ограничение доступности железа представляет собой важный компонент защитной системы макроорганизма. Для преодоления железодефицитных условий патогены, включая возбудителя туляремии, выработали специализированую стратегию, такую как синтез высокоаффинных железохелатирующих соединений – сидерофоров, индуцируемых при снижении количества Fe^{2+} [Kramer J. et al.,

2020]. У *F. tularensis* эту функцию выполняет ризосферрин, экспрессия которого регулируется сидерофорным опероном *fslABCDEF* [Ramakrishnan G. et al., 2019]. Кроме того, в накоплении и утилизации железа учавствуют транспортные белки FeoA и FeoB, образующие единственную систему переноса Fe^{2+}через внутреннюю мембрану у *F. tularensis* [Pérez N. et al., 2016].

Поглощение железа патогенными микроорганизмами требует строгого контроля, поскольку избыток ионов железа повышает токсичностьH_2O_2, за счёт генерации высокореактивных гидроксильных радикалов [Ramakrishnan G. et al., 2017]. Белок Bfr выполняет функцию депонирования Fe^{2+} и обеспечивает защиту от цитотоксического действия активных форм кислорода, образующихся в присутствии свободного железа. Делеция гена *bfr* вызывает накопление несвязанного Fe^{2+}, усиление токсического действия H_2O_2 и последующую гибель бактерильных клеток [Fletcher J.R. et al., 2018]. Показано, что выделяемый из вакцинного штамма комплекс, состоящий из Bfr и О-антигена, за счет выраженной иммуногенной активности, демонстрирует эффективную защиту мышей от заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 [Кузнецова Е.М. и др. 2019].

В процессе эволюционной адаптации у *F. tularensis* сформировалась уникальная система регуляции стрессового ответа, опосредованная σ^{32}-фактором (RpoH). Она координирует экспрессию генов кодирующих белки теплового шока, включая шаперонные системы (HSP_{40}, GroEl/GroEs, DnaK/DnaJ/GrpE) и протеазы (ClpB, ClpX, ClpP, HtpG). Так, избыток в культуральной жидкости σ^{32} приводит к двукратному увеличению синтеза белков теплового шока, что подтверждает его центральную роль в стрессовой адаптации туляремийного микроба [Grall N. et al., 2009].

Шаперонный комплекс ClpB-DnaK, обладающий консервативной структурой, способен восстанавливать сильно агрегированные белки. Он обеспечивает устойчивость *F. tularensis* к длительному воздействию экстремальных температур (до 50 ^{o}C), что способствует внутриклеточной репликации патогена в макрофагах теплокровных животных. Моделирование *in silico* выявило, что мутация амино-

кислотных остатков комплекса, взаимодействующих с ДНК, повышает чувствительность микроорганизма к тепловому шоку без влияния на вирулентность. В то же время, делеция N-концевого домена ClpB незначительно затрагивает термотолерантность, но существенно снижает вирулентность [Alam A. et al., 2018].

Ключевым шаперонным комплексом является GroEl/GroEs, который индуцируется как при тепловом, так и при окислительном стрессе. Показано, что синтез данных белков активируется при повышении температуры с 37 ^{o}C до 42 ^{o}C и под воздействием 5 мМ H_2O_2. Резистентность к пероксиду водорода определяет успешность внутриклеточной персистенции *F. tularensis*, поскольку проникновение в макрофаги сопровождается интенсивным окислительным стрессом. [Ericsson M. et al., 1994]. В исследованиях также отмечено, что при температурном стрессе GroEl/GroEs способен секретироваться в окружающую среду [Горбатов А.А., и др., 2017].

Помимо острова патогенности, значимыми факторами вирулентности являются системы секреции типа VI (T6SSs). Это белковые комплексы, состоящие из 13–14 субъединиц, функционируют по принципу гарпуна, и необходимы для выхода бактерии из фагосом после завершения внутриклеточной репликации [Tian D et al., 2019]. На модели *F. tularensis* subsp. *novicida* были охарактеризованы 6 белков-эффекторов T6SSs: PdpC, PdpD, OpiA, OpiB1, OpiB2, OpiB3 [Eshraghi A. et al., 2016]. Все эти белки обнаружены и у других подвидов туляремийного микроба, за исключением PdpD, он отсутствует у *F. tularensis* subsp. *holarctica* [Nano F.E. et al., 2004]. PdpD и PdpC являются двумя ключевыми эффекторами, необходимыми для выхода бактерий из фагосомы в цитозоль хозяина. Делеция либо *pdpC*, либо *pdpD* незначительно снижает активность фагосомального выхода, но мутант *F. tularensis* subsp. *novicida* с делецией обоих этих генов (*ΔpdpC, ΔpdpD)* полностью утрачивает способность выходить из макрофагов [Brodmann M. et al., 2017]. Удивительно, но *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, с делецией *pdpD* и *pdpC*, был обнаружен в поврежденных фагосомах организма-хозяина. Это позволяет предположить, что на разрушение мембраны фагосомы влияют и другие эффекторы [Lindgren M. et al.,

2013]. Молекулярные механизмы действия белков PdpC и PdpD остаются неизвестными.

Таким образом, *F. tularensis* обладает сложной системой адаптации к стрессовым условиям, включая уникальные структурные компоненты (ЛПС, везикулы внешней мембраны, капсулоподобный комплекс) и регуляторные механизмы (FPI, T6SS, антиоксидантные и шаперонные системы). Эти факторы обеспечивают выживаемость бактерии в макрофагах, устойчивость к иммунному ответу хозяина и вирулентность. Изучение этих механизмов открывает перспективы для разработки эффективных вакцин и диагностических препаратов против туляремии.

***

Анализ литературных данных свидетельствует, что адаптация *F. tularensis* к условиям макроорганизма и реализация её патогенного потенциала обеспечиваются системой взаимосвязанных молекулярных механизмов. При этом функции и диагностическая значимость секретируемых стресс-белков, выделяющихся при стресс-воздействии, остаются малоизученными и представляют существенный практический интерес. Эти антигены, распознаваемые иммунной системой как чужеродные, служат мишенями для иммунного ответа и способны индуцировать специфический иммунитет, что делает их перспективными для использования в диагностических и профилактических препаратах.

Существующие методы оценки функционального состояния бактериальных клеток, особенно для таких требовательных микроорганизмов, как *F. tularensis*, имеют существенные ограничения: длительность выполнения, необходимость фиксации клеток и невозможность мониторинга в реальном времени. Применение комплексного методического подхода для исследования стресс-реакций туляремийного микроба позволит не только расширить представления об адаптационных механизмах бактерий, но и целенаправленно регулировать воздействие на патоген для оптимизации продукции экскретируемых стресс-белков.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы бактерий, использованные в работе

Все работы с патогенными биологическими агентами II–IV групп патогенности выполняли в соответствии с требованиями действующих Санитарных правил и норм 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Штаммы, использованные в работе, получены из Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и соответствовали типичным характеристикам по культуральным, морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам. Видовые и родовые названия штаммов микроорганизмов, использованных в работе, и источники их получения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Перечень штаммов *Francisella tularensis*, использованных в работе

Штамм	Подвид, биовар	Источник/место выделения	Примечание
F. tularensis 15 НИИЭГ	subsp. *holarctica*, eryR	Получена Н.А. Гайским из вирулентного штамма, СССР, 1942 г.	Вакцинный штамм
F. tularensis КМ-9 (Cap$^-$)	subsp. *holarctica*, eryS	Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 2011 г.	Бескапсульный дериват вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ
F. tularensis Kosho	subsp. *holarctica*, биовар *japonica*	Получен от человека, Япония, 1973 г.	–

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4
F. tularensis A-61(117)	subsp. *mediasiatica*	Получен от иксодовых клещей, Узбекистан, 1960 г.	–
F. tularensis B-399 A-Cole	subsp. *tularensis*	Получен от человека, США, 1972 г.	–
F. tularensis B-399 A-Cole Str^R 2500/k	subsp. *tularensis*	НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 1991 г.	Стрептомицинустой чивый дериват мутант *F. tularensis* B-399 A-Cole
F. tularensis Utah112	subsp. *novicida*	Получен из воды, США, 1951 г.	–
F. tularensis 503/840	subsp. *holarctica*	Получен из клещей *D. pictus*, Московская область, 1980 г.	–
F. tularensis КМ-3 (21Л)	subsp. *holarctica* eryS	Получен от лемминга, Якутия, 1976 г.	–

В работе по определению специфичности экспериментальных антител к антигенам туляремийного микроба использовали клетки штаммов гетерологичных микроорганизмов *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, *Y. pestis* КМ 218, *Y. pestis* КМ 225; *Y. pseudotuberculosis* 31; *Shigella sonnei* 714, *Sh. sonnei* 37; *Vibrio cholerae* O139 M353, *V. cholerae* O1 M818 Эль-Тор, *V. cholerae* O1 M801 Огава

2.2 Реактивы и питательные среды

Для приготовления рабочих растворов применяли реактивы зарубежного и отечественного производства квалификации чистоты «хч» и «чда», использовали дистиллированную воду (ГОСТ Р 58144-2018) и воду MilliQ (Merck, Германия).

Исследуемые штаммы *F. tularensis* выращивали на твердых питательных средах FT (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия), и бульонах: Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия), Чемберлена, Т-среде и Д-бульоне (Таблица 3), при различных температурах (диапазон культивирования от 37 °С до 42 °С). Для получения протективных антигенов *F. tularensis* 15 НИИЭГ использовали колбы Эрленмейера и шейкер-инкубатор «Multitron II» (Infors, США). Глу-

бинное культивирование проводили в лабораторном ферментере объемом 1 литр с автоматической системой контроля параметров культивирования.

Для культивирования гетерологичных штаммов использовали питательные среды Хоттингера (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора) и LB (HiMedia, Индия).

Таблица 3 – Состав питательных сред, использованных в работе

Среда	Состав
Среда Чемберлена [Chamberlain R.E., 1965]	На 100 мл: L-аргинин – 40 мг; аспарагиновая кислота – 40мг; L-цистеин HCl – 20 мг; L-гистидин – 20 мг; DL-изолейцин – 40 мг; L-лейцин – 40 мг; L-лизин – 40 мг; DL-метионин – 40 мг; L-пролин – 200мг; DL-серин – 40 мг; DL-треонин – 200мг; L-тирозин – 40 мг; DL-валин – 40 мг; Тиамин HCl – 0,4 мг; кальция пантотенат – 0,2 мг; глюкоза – 400мг; NaCl – 1 г; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 12,5мг; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2 мг; KH_2PO_4 – 100мг; K_2HPO_4 – 100мг.
Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *F. tularensis* (Д-бульон) [Лапин А.А. и др., 2009]	На 100 мл: кислотный гидролизат казеина – 0,5 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г; цистеина гидрохлорида моногидрат – 10 мг; фосфат калия однозамещенный – 1,2 г; калий гидроксид – 0,4г; натрий хлористый – 0,5 г; сульфат железа (II) семиводный – 0,6 мг; глюкозы – 1 г; pH среды – 7,2.
Среда туляремийная (Т) [Павлович Н.В. и др., 1987]	На 100 мл: 1г. сердечно-мозгового настоя, 1г. бактопептона; 1г. дрожжевого экстракта; 1г. казаминовых кислот.
Фибриновая среда [Патент RU № 2518282]	На 100 мл: сухой ферментативный гидролизат фибрина – 5–5,5 г.; глюкоза – 1 г.; пантотенат кальция – 5 мг.
Добавка к Т-среде [Павлович Н.В. и др., 1987]	На 100 мл: 0,1 г $MgSO_4 \times H_2O$; 0,2 г $FeSO_4$; 1,2 г L-цистеин; 2,4 г – натрий лиммонокислый; 4 г – KCl; 8 г – K_2HPO_4; 30 г – глюкоза. Добавку добавляют по 5 мл на каждые 100 мл питательной среды.

2.3 Лабораторные животные

В экспериментах использовали животных из питомника ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора: мышей линии BALB/c

(возраст 6–8 недель, масса 18–20 г), кроликов породы Шиншилла (8–9 недель, 2200–2500 г) и морских свинок (5–7 недель, 350–450 г).

Содержание и работа с животными проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента 2010/63/EU «О защите животных, используемых в научных целях» и протоколами, утверждёнными биоэтической комиссией института. Все процедуры выполнялись в виварии с уровнем биологической безопасности BSL-3.

2.4 Микробиологические методы

Концентрацию бактериальных клеток в пробах контролировали с использованием отраслевого стандартного образца мутности 10 ЕМ (ОСО 42-28-85 ФГБУ НЦЭСМП, Россия), согласно которому 1 МЕ соответствует мутности взвеси туляремийного микроба в концентрации 5×10^9 м.к./мл. Концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) определяли методом высева на агаризованные среды с последующим подсчетом колоний через 48–72 ч.

Чистоту культуры контролировали бактериоскопией мазков, окрашенных по Граму, посевом на агаризованные среды и в реакции агглютинации с коммерческой лошадиной туляремийной сывороткой (КТС, Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Россия).

Приготовление и окраску мазков бактериальных суспензий и мазков-отпечатков от экспериментальных животных проводили по стандартным методикам с использованием окраски по Граму и Романовскому-Гимзе [Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней, 2013].

2.5 Биоинформационные методы

Последовательности ДНК целевых генов были взяты из базы данных NCBI GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Праймеры были рассчитаны с

помощью программы «Primer Express» (ThermoFisher, США). С целью достижения достаточной специфичности и высокой эффективности амплификации использовали алгоритм «BLAST» (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Зонды TaqMan подбирали в онлайн-режиме на интернет-сайте www.genscript.com.

Степень взаимодействия между белками и кодируемыми исследуемыми генами определяли с помощью базы данных «String» (https://string-db.org/).

2.6 Молекулярно-генетические методы

Получение бактериальной ДНК и кДНК

Экстракцию ДНК и РНК штаммов *F. tularensis* осуществляли согласно требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Выделение бактериальной ДНК проводили с использованием набора «AxyPrep» (Axygen Biosciences, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные препараты ДНК использовали для последующих исследований методом ПЦР и полногеномного секвенирования.

Выделение бактериальной РНК проводили с использованием набора «PureLink RNA» (Invitrogen, США), по протоколу производителя. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК для последующего анализа методом ОТ-ПЦР осуществляли с использованием набора «Реверта-L» (AmpliSens, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную кДНК хранили при температуре минус 70 °С и использовали для последующего ПЦР-анализа.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для проведения ОТ-ПЦР применяли программируемый амплификатор «Rotor-Gene 6000» (Qiagen, Германия). Для приготовления реакционной смеси использовали (общий объем 25 мкл): 2,5 мкл 10× буферный раствор для ПЦР; 2,5 мкл 25 мМ раствора магния хлорида ($MgCl_2$); 2,5 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), в концентрации 2 мМ каждого; 0,2 мкл (5 ед.) Taq-полимеразы;

праймеры – по 1 мкл (10 пМ); зонды формата TaqMan – по 0,5 мкл (5 пМ). Объем кДНК-матрицы и конечный объем деионизованной воды варьировали в зависимости от эксперимента.

Условия проведения ОТ-ПЦР включали предварительную денатурацию при температуре 95 °С в течение 5 мин, затем 45 циклов, включающих денатурацию при температуре 95 °С в течение 30 с, отжиг при температуре 55–63 °С (в зависимости от праймеров) – 30 с и элонгацию при температуре 72 °С в течение 30 с. Для анализа данных ПЦР использовали программное обеспечение «Rotor-Gene 6000» (версия 1.8, Qiagen, Германия). Детекция флуоресцентного сигнала происходила во втором блоке циклирования при температуре, индивидуальной для каждой пары праймеров, по каналу Green/FAM (фильтр детекции 460±20 нм). Определение относительного уровня экспрессии целевых генов осуществляли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak et al., 2001], с учетом уровня гена-нормализатора.

Цифровая капельная ПЦР (цкПЦР)

цкПЦР проводили с использованием системы «ddPCR QX200» (Bio-Rad, США). Для каждого образца заготавливали 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл двукратного «QX200 ddPCR SuperMix» (Bio-Rad, США), 5 мкл свободной от ДНКаз воды, по 0,8–1 мкл (8–10 пМ) праймера (прямого и обратного), 0,5 мкл (5 пМ) зонда и 1 мкл кДНК с конечной концентрацией 100 нг к объему реакционной смеси.

ПЦР-пробу, содержащую кДНК, реакционную смесь (ddPCR Supermix) и масло, вносили в ячейки одноразового 8-канального картриджа для генерации микрокапель. В генераторе происходило формирование стабильной эмульсии, содержащей примерно 20000 монодисперсных нанолитровых капель для каждого образца. Далее их переносили в 96-луночный планшет для последующей ПЦР-амплификации.

Анализ данных ПЦР производился с помощью устройства для считывания капель «QX200 droplet reader» (Bio-Rad, США) и программного обеспечения QuantaSoft v1.7.4 (Bio-Rad, США). Абсолютная количественная оценка каждого

транскрипта была представлена в виде числа копий транскрипта на микролитр амплифицированной смеси для ПЦР. Порог устанавливали преимущественно вручную, основываясь на данных графиков амплитуды флуоресценции: любые капли выше порога считали «положительными», ниже – «отрицательными».

Для анализа результатов цкПЦР рассчитывали соотношение количества копий гена в опыте к контролю. Полученные значения усреднялись и нормировались.

Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование субкультур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ осуществляли на платформе «DNBSEQ-G50RS» (MGI, Китай) с использованием наборов для пробоподготовки «MGIEasy FS DNA Library Prep Set» (MGI, Китай) и секвенирования ДНК «DNBSEQ-G50» (MGI, Китай). Выравнивание полученных прочтений на полный геном штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (номер в международной базе данных NCBI GenBank CP066295, Россия, 2021) осуществляли с помощью программного пакета «DNASTAR Lasergene 15.3» [https://www.dnastar.com]. Средний размер полученных геномов составил 1,8 м.п.н., а средняя глубина покрытия – 48×. Гибридную сборку ридов в контиги осуществляли с помощью программы «Unicycler v. 0.4.4» [Wick R.R. et al., 2017].

2.7 Биохимические и иммунохимические методы

Концентрацию белка определяли по O.H. Lowry [Lowry O.H., 1951] с использованием набора «Protein Assay» (Bio-Rad, США) при длине волны 750 нм. Калибровочную кривую строили по серии разведений БСА. Содержание углеводов оценивали спектрофотометрически при длине волны 490 нм [Государственная фармакопея, 2015]. Количество липидов определяли бихроматным методом на спектрофотометре при 650 нм [Amenta J., 1964]. Суммарное количество нуклеиновых кислот определяли по методу А.С. Спирина [Государственная фармакопея, 2015].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата

натрия (SDS-PAGE) проводили по U.K. Laemmli [Laemmli U.K., 1970] на приборе «Mini Protean II» (Bio-Rad, США). Разделение образцов осуществляли с использованием 4 % концентрирующего и 10-12,5 % разделяющего гелей в трис-глициновом буфере (pH 8,3) с 0,1 % SDS. Белки визуализировали окрашиванием Кумасси синим R–250 (ДиаМ, Россия), а ЛПС выявляли с помощью окраски нитратом серебра с использованием набора реактивов «Silver Stain» (Bio-Rad, США).

Для определения иммунохимической активности антигенов применяли иммуноблоттинг по методу H. Towbin [Towbin H., 1979]. Антигены переносили из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану методом электрофореза. Первичными антителами служили специфические иммуноглобулины к белкам Bfr, HSP или GroEl/GroEs, либо КТС в разведении 1:100. В качестве конъюгата использовали антивидовые иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США).

Иммуноферментный анализ проводили в планшетах для ИФА однократного применения (АО «Фирма Медполимер», Россия) с использованием экспериментальных препаратов антител и антигенов. В качестве конъюгатов применяли антивидовые антитела, меченые пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США). Инкубацию с субстратом проводили в 0,04 % 2,2'-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота) (ABTS) на 0,1 М цитратно-фосфатном буферном растворе (pH 5,4±0,1). Через 15 минут ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,05 мл 1 М серной кислоты в каждую лунку. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 490 нм на планшетном ридере «IMark» (Bio-Rad, США). Пробу считали положительной при превышении её оптической плотности относительно среднего значения отрицательных контролей в 2 и более раза [Егоров А.М., 1991].

При постановке дот-иммуноанализа (ДИА) в качестве твердой фазы использовали нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,22 мкм (Владисарт, Россия). Фиксацию препаратов проводили в течение 10 мин при температуре 90 °С. Неспецифические сайты связывания блокировали 1 % раствором БСА. В качестве

конъюгата использовали антивидовые антитела, меченые пероксидазой хрена (Bio-Rad, США), с последующей визуализацией о-дианизидином.

2.8 Иммунобиологические методы

Получение иммунных сывороток

Экспериментальные кроличьи сыворотки получали согласно схемам, представленным в главе 5. Иммуноглобулины выделяли из нативных кроличьих сывороток методом осаждения сульфатом аммония по общепринятой методике [Фримель Г., 1987].

Реакция лейкоцитолиза

Постановку и учет реакции лейкоцитолиза крови вакцинированных и иммунизированных животных проводили согласно МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией».

Получение первичных иммунных клеток *F. tularensis* для анализа внутриклеточной динамики роста и генной экспрессии бактерий

Перитонеальные макрофаги и лимфоциты крови получали стандартными методами от морских свинок согласно МУ 3.3.1.2161-07 «Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба», после чего их обрабатывали и вносили в свежую среду 199 с 10 % сывороткой КРС и добавлением 100 мкг/мл пенициллина. Чашки с клетками переносили в CO_2 инкубатор с температурой 37 ^{o}C на сутки. По окончании инкубации измеряли концентрацию клеток, отмывали от питательной среды и переносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета со свежей средой 199 до конечной концентрации 5×10^5 клеток. После этого снова переносили в CO_2 инкубатор с температурой 37 ^{o}C на 18 ч для закрепления [Aloni-Grinstein R.A. et al., 2015].

Определение токсичности антигенов

Антигены HSP, GroEl/GroEs, Bfr оценивали на аномальную токсичность в эсперименте *in vivo* на белых мышах и морских свинках (при внутрибрюшинном и подкожном введении, 100 и 1000 мкг препарата соответственно). Контрольной

группе вводили равный объем 0,9 % раствора NaCl (pH 7,2). Критерием отсутствия токсичности препаратов служила 100 % выживаемость биомоделей в течение 7-дневного наблюдения. В этот период ежедневно регистрировали массу тела, внешний вид и поведенческие реакции животных.

Определение иммуногенности антигенов

Иммуногенные свойства полученных препаратов исследовали в эксперименте *in vivo* на белых мышах, проводя контрольное заражение вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840. Для математического анализа доза-эффект применяли метод Кербера, на основании которого определяли значения ED_{50} и LD_{50}.

2.9 Биофизические методы

Электрооптический анализ

Мониторинг физиологического состояния бактериальных клеток проводили на автоматизированной аналитической системе «EloTrace 3.0» (EloSystems, Германия) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Пробоподготовка проходила автоматически и включала сепарацию клеток от культуральной среды методом мембранной фильтрации через целлюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм с последующим ресуспендированием клеточного концентрата в воде MilliQ, обладающей удельной проводимостью 5 мкСм·см$^{-1}$. Оптическую плотность полученной суспензии доводили до значения OD_{600} = 0,1±0,05 перед проведением электрооптических измерений. В ходе исследования регистрировали три ключевых параметра: анизотропию поляризуемости (АП, усл. ед.), концентрацию бактериальных клеток и средний размер клеточных частиц. Измерения выполняли как в режиме дискретного анализа отдельных проб, так и при непрерывном мониторинге в реальном времени, что позволило получить комплексную оценку физиологического состояния исследуемой культуры.

Спектрометрический анализ

Исследование температурной стабильности белков проводили на спектрофлуориметре «Duetta» (Horiba, Япония). Стабильность конформации

оценивали по флуоресцентным спектрам триптофана (возбуждение 280 нм), анализируя положение максимума эмиссии (λ_{max}) в характерном для белков диапазоне 328–350 нм [Кантор Ч.Р., 1984].

Атомно-силовая микроскопия

Изучение размеров бактериальных клеток, а также их морфометрических характеристик проводили с использованием атомно-силового микроскопа «Solver P47-PRO» (ООО «НТ-МДТ», Россия).

Для проведения АСМ бактериальные суспензии готовили в соответствии с МУ 1.3.3103-13 «Организация работ лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Иммобилизацию клеток осуществляли на поверхности свежесколотой слюды. Исследования проводили в двух режимах: полуконтактном (используя кремниевые кантилеверы NSG01 (ООО «НТ-МДТ», Россия) с золотым напылением, резонансной частотой 120 кГц и жесткостью 5,5 Н/м) и контактном (с кантилеверами CSG10 (ООО «НТ-МДТ», Россия), резонансной частотой 20 кГц и жесткостью 0,1 Н/м). Сканирование выполняли на участках размером 5×5 мкм с разрешением 512×512 пикселей при скорости сканирования 1 Гц. Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения «Nova Px» (ООО «НТ-МДТ», Россия).

Проточная цитофлуориметрия

Для оценки апоптоза и пролиферации клеток использовали проточную цитофлуориметрию на анализаторе «CyAn» (Beckman Coulter, США). Спленоциты окрашивали раствором пропидия йодида в концентрации 50 мкг/мл, что позволяло достоверно определять процент апоптотических и пролиферирующих клеток. В качестве отрицательного контроля использовали спленоциты интактных животных, не подвергавшихся иммунизации.

2.10 Статистическая обработка результатов исследования

Все экспериментальные исследования, включая культивирование микроорганизмов, микробиологические, биофизические, биологические и иммунохимические методы, проводили в трех независимых повторностях. Статистический анализ данных выполняли с использованием пакетов прикладных программ «Excel» (Microsoft Inc., США) и «STATISTICA 12» (Dell Technologies Inc., США). Для оценки взаимосвязей между количественными параметрами применяли непараметрический коэффициент корреляции Спирмена с последующей интерпретацией результатов по шкале Чеддока: значения менее 0,3 рассматривали как слабую корреляцию, 0,3–0,5 – умеренную, 0,5–0,7 – заметную, 0,7–1,0 – высокую степень корреляционной зависимости. Статистически значимыми считали результаты при уровне значимости $p < 0,05$.

Количественную оценку данных ОТ-ПЦР проводили методом относительной экспрессии $2^{-\Delta\Delta CT}$ с нормализацией относительно эталонного гена. Статистическую значимость межгрупповых различий определяли с использованием непараметрических методов: критерия Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением по методу Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения. Уровень статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

Абсолютные концентрации целевых ДНК-последовательностей и 95 % доверительные интервалы рассчитывали на основе Пуассоновского распределения, с использованием полученных экспериментальных данных.

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СПОСОБА МОНИТОРИНГА СТРЕСС-АДАПТАЦИИ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Белки теплового шока GroEl/GroEs и бактериоферритин Bfr являются ключевыми компонентами системы стресс-ответа *F. tularensis*, обеспечивающими адаптацию микроорганизма к температурному шоку, окислительному стрессу и дефициту железа. Анализ экспрессии генов, кодирующих эти белки, представляет значительный интерес как для фундаментального понимания механизмов бактериальной адаптации, так и для разработки новых диагностических подходов. Современные молекулярно-генетические методы, включая ОТ-ПЦР и цкПЦР, благодаря своей высокой чувствительности и специфичности, позволяют проводить точную количественную оценку динамики экспрессии генов в различных физиологических условиях. Однако в настоящее время в научной литературе отсутствуют систематизированные данные о корегуляции экспрессии генов *groEl*, *bfr* и связанного с ними сигма-фактора (*rpoH*) у *F. tularensis*, что определяет необходимость разработки соответствующих методов детекции.

Результаты исследования молекулярно-генетической адаптации туляремийного микроба к стресс-условиям могут быть применены для контроля качества вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, оценки безопасности бактериальных культур и разработки новых стратегий инактивации патогена через таргетное воздействие на систему его стресс-ответа.

Таким образом, предлагаемая разработка методов детекции экспрессии стресс-генов обладает существенным потенциалом для развития как фундаментальных исследований механизмов бактериальной адаптации, так и прикладных аспектов медицинской микробиологии и биотехнологии.

3.1 Биоинформационный анализ и подбор специфических праймеров и зондов для детекции стресс-реакции туляремийного микроба

Ключевым этапом в разработке метода ПЦР-детекции уровня экспрессии стресс-генов у возбудителя туляремии является выбор мишеней. Для идентификации генов, перспективных в качестве ДНК-матрицы, был проведен анализ отечественных и зарубежных публикаций, посвященных детекции генов стресса с помощью ПЦР в образцах различного происхождения (Таблица 4).

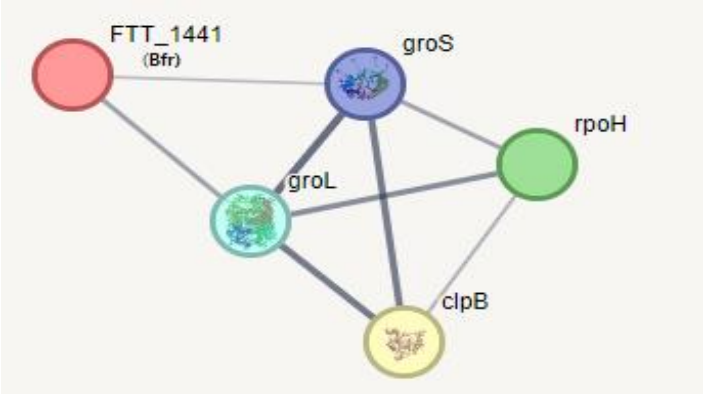
Таблица 4 – Анализ научных исследований, посвященных молекулярно-генетическим методам для детекции ДНК и РНК генов стресса туляремийного микроба

Ген/ промотор	Кодируемый белок	Функции белка	Источник
bfr	Bfr	Выполняет функцию депонирования железа и участвует в защите клетки от повреждающего действия активных форм кислорода, образующихся при наличии свободного железа	Ramakrishnan, 2017; Fletcher et al., 2018.
groEl	GroEl, GroEs	Выделяются в ответ на тепловой и перекисный стресс, являются факторами персистенции в макрофагах	Ericsson et al., 1994.
rpoH	RpoH	Функционирует как ключевой регулятор транскрипции генов теплового шока и ряда других глобальных стрессовых ответов	Grall et al., 2009.
clpB	ClpB	Индуцируется при воздействии теплового шока, окислительного стресса, низкого pH. Является фактором вирулентности и необходим для размножения в макрофагах	Meibom et al., 2008.
fslB	FslB	Белок-сидерофор внутренней мембраны *F. tularensis*. Индуцируется при снижении уровня железа в клетке	Pérez et al., 2016.

Все гены, показанные в таблице 4, изучались авторами только на одном подвиде туляремийного микроба. С целью проверки универсальности последовательностей для разных подвидов туляремийного микроба проводили биоинформационный анализ с использованием алгоритма BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov), а

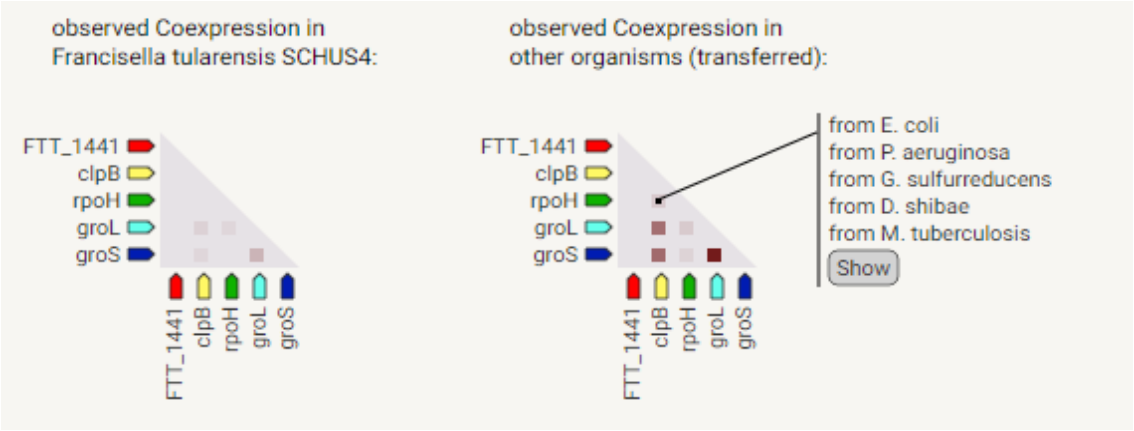
также путем определения кривых плавления для проб каждого из подвидов. В результате были отобраны наиболее подходящие гены: *rpoH, groEl, bfr*.

Для предварительной оценки степени взаимодействия между белками, кодируемыми данными генами, а также коэкспрессии исследуемых генов, использовали базу данных «STRING» (Рисунок 1, 2).



Насыщенность цвета линий взаимодействия представляет собой показатель достоверности функциональной ассоциации

Рисунок 1 – Сеть белок-белковых взаимодействий, визуализируемая с помощью базы данных «STRING»



Насыщенность цвета блоков отражает степень коэкспрессии генов

Рисунок 2 – Показатели коэкспрессии генов туляремийного микроба на модели *F. tularensis* SCHU S4

На основании полученных данных можно отметить, что все исследуемые белки функционально взаимосвязаны, за исключением Bfr. Хотя данный белок

также относится к стрессовым, экспрессия гена *bfr* демонстрирует лишь опосредованную связь с другими изучаемыми генами.

Для количественной оценки экспрессии стресс-генов туляремийного микроба применяли полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и количественной оценкой результатов по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$, основанного на сравнении уровня экспрессии целевого гена в разных образцах с помощью внутреннего контроля – гена, который экспрессируется стабильно вне зависимости от условий [Livak K.J. et al., 2001]. В качестве гена-калибратора использовали ген 16s rRNA [Forsman M. et al.,1994].

Олигонуклеотиды для проведения ПЦР в реальном времени были рассчитаны с использованием программы «Primer BLAST» (URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, дата обращения 25.11.2024 г.) и синтезированы в лаборатории генодиагностических препаратов ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Их последовательности представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Последовательности праймеров и зондов, комплементарных к исследуемым генам

ДНК-мишень	Наименование праймера	Последовательность праймера 5’ – 3’
bfr	BFR-F	TGGATGCTCACCAAAGTGAGTT
	BFR-R	CGAAATGTCTGGAATTGTGCGT
	BFRPROBE	FAM-CACCTGCTGCAGTAGCATGAGT-BHQ1
groEl	GROEL-F	GGCGGTGAGTCTTCTGTAGT
	GROEL-R	CCGATCATCGCCTCTGTAGT
	GROELPROBE	(FAM)-ACTCGTTCAGCTCTACAACATGCTGCT-(BHQ1)
rpoH	RPOH-F	AGCTGAAGAGCTAGGTGTCAA
	RPOH-R	TCTTGCTGAACAACTTGATGCT
	RPOHPROBE	FAM-TGCTGCGAAGTTTGCTCACCGTCA-BHQ1
16s rRNA	16sRNA-F	GCTGAGGCTCAATCTTATG
	16sRNA-R	GCAAATCTCTAGATGGTGTTAC
	16sRNA PROBE	FAM-CTGCAACACTATCAACCATATC-BHQ1

3.2 Подбор условий проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для детекции уровня экспрессии стресс-генов *groEl, bfr, rpoH*

На первом этапе работы был произведен расчет температуры отжига для праймеров и зондов (Таблица 6) по формуле:

$$T_{отжига}=2\times(T+A)+4\times(C+G)-5[℃]$$

где A, T, C, G – число соответствующих нуклеотидов в составе праймера или зонда.

По расчетным данным были получены значения, представленные ниже (Таблица 6).

Таблица 6 – Расчетные данные по температуре отжига праймеров и зондов

Наименование	*bfr*	*groEl*	*rpoH*	16s rRNA
Прямой праймер (forward)	59 °C	57 °C	57 °C	55 °C
Обратный праймер (reverse)	59 °C	57 °C	57 °C	57 °C
Зонд	63 °C	75 °C	69 °C	61 °C

Поскольку температура отжига для праймеров и зондов отличается, необходимо подобрать оптимальную температуру для одного набора. Для этого была проведена термоградиентная ПЦР для определения оптимальной температуры отжига праймеров и зондов. Для каждого целевого гена использовалось одинаковое количество кДНК. Эксперимент проводили при температурах в диапазоне 55–63 °C с интервалом в 1 °C. Итогом эксперимента была подобранная для каждой пары праймеров программа амплификации с учетом температуры отжига и эффективным числом циклов амплификации (Таблица 7). Концентрации праймеров и зондов составили 10 пМ/мкл и 5 пМ/мкл.

Таблица 7 – Условия амплификации для проведения ПЦР с обратной транскрипцией

№		Этап	*bfr*	*groEl*	*rpoH*	*16s rRNA*
1		Первоначальный прогрев реакционной смеси	95 °С 5 мин			
2	Количество циклов – 45	Денатурация	95 °С 30 с			
3		Специфический отжиг праймеров	59 °С 30 с	57 °С 30 с	57 °С 30 с	56 °С 30 с
4		Элонгация	72 °С 30 с			

Флуоресцентный сигнал детектировали в конце каждого цикла амплификации при температуре отжига, оптимизированной для каждой пары праймеров, используя канал Green/FAM (фильтр детекции 460±20 нм).

Для оценки специфичности праймеров и зондов использовали кДНК, полученную из бактериальных суспензий туляремийного микроба разных подвидов, а также гетерологичных микроорганизмов (*Y. pestis, Y. pseudotuberculosis, V. cholerae*).

Далее проводили подбор оптимального количества кДНК в реакционной смеси. Для этого использовали концентрацию матрицы от 20 до 200 нг вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Было показано, что оптимальным значением данного фактора является 200 нг/проба. Для остальных образцов также использовали концентрацию 200 нг (Таблица 8, Рисунок 3). В таблице результатов фиксировали значения порогового цикла (Ct) для каждой пробы.

Таблица 8 – Результаты анализа проб бактериальных суспензий *F. tularensis* и гетерологичных микроорганизмов методом ОТ-ПЦР с исследуемыми праймерами и зондами.

Штамм	Концен-трация матрицы	Значения порогового цикла (Ct)			
		bfr	*rpoH*	*groEl*	*16s rRNA*
F. tularensis subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ	200 нг	21,85	15,00	23,43	19,97
	100 нг	30,75	24,73	27,41	29,58
	80 нг	33,60	24,80	33,44	29,93
	40 нг	–	30,61	–	31,91
	20 нг	–	–	–	–
F. tularensis subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^-)	200 нг	16,10	11,94	22,86	15,40
F. tularensis subsp. *novicida* Utah 112	200 нг	14,43	9,21	18,53	19,69
F. tularensis subsp. *holarctica* 503/840	200 нг	23,41	17,77	22,60	19,35
F. tularensis subsp. *holarctica* Kosho	200 нг	15,79	9,17	20,49	17,72
F. tularensis subsp. *mediasiatica* A61	200 нг	18,71	12,70	21,76	19,10
F. tularensis subsp. *tularensis* B399 A-Cole	200 нг	15,02	10,66	20,76	16,28
F. tularensis subsp. *tularensis* B-399 A-Cole StrR 2500/k	200 нг	16,43	11,55	21,81	15,98
Y. pestis EV	200 нг	–	–	–	–
Y. pseudotuberculosis 31	200 нг	–	–	–	–
Sh. sonnei 714	200 нг	–	–	–	–
V. cholerae O139 M353	200 нг	–	–	–	–
V. cholerae M818 Эль-Тор	200 нг	–	–	–	–
V. cholerae M801 Огава	200 нг	–	–	–	–
Отрицательный контроль	–	–	–	–	–

*Примечание: «–» отсутствие специфической амплификации

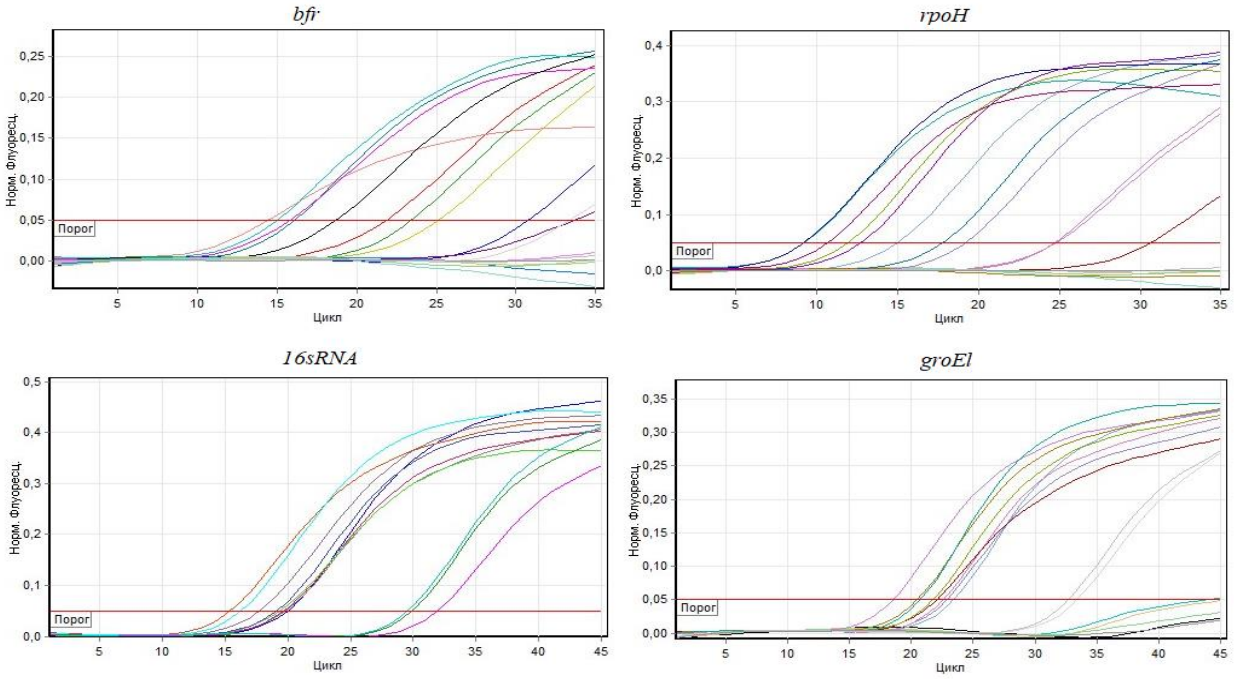


Рисунок 3 – Результаты анализа проб бактериальных суспензий *F. tularensis* и гетерологичных бактериальных культур методом ОТ-ПЦР с исследуемыми праймерами и зондами

Установлено, что все наборы праймеров и зондов специфичны к *F. tularensis*, независимо от подвида. В пробах, не содержащих кДНК туляремийного микроба, флуоресценции по каналу FAM обнаружено не было.

3.3 Подбор условий проведения цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) для оценки уровня экспрессии генов *bfr, groEl* и *rpoH*

цкПЦР представляет собой перспективный метод молекулярной диагностики, обладающий рядом значимых преимуществ по сравнению с традиционными подходами. Данная технология позволяет осуществлять точное и воспроизводимое определение абсолютного количества копий целевых последовательностей ДНК/РНК без необходимости построения калибровочных кривых и наличия генов-калибраторов. Важными характеристиками метода являются его высокая устойчивость к ингибиторам ПЦР, простота интерпретации результатов и возможность проведения абсолютного количественного анализа [Kojabad A.A. et al.,

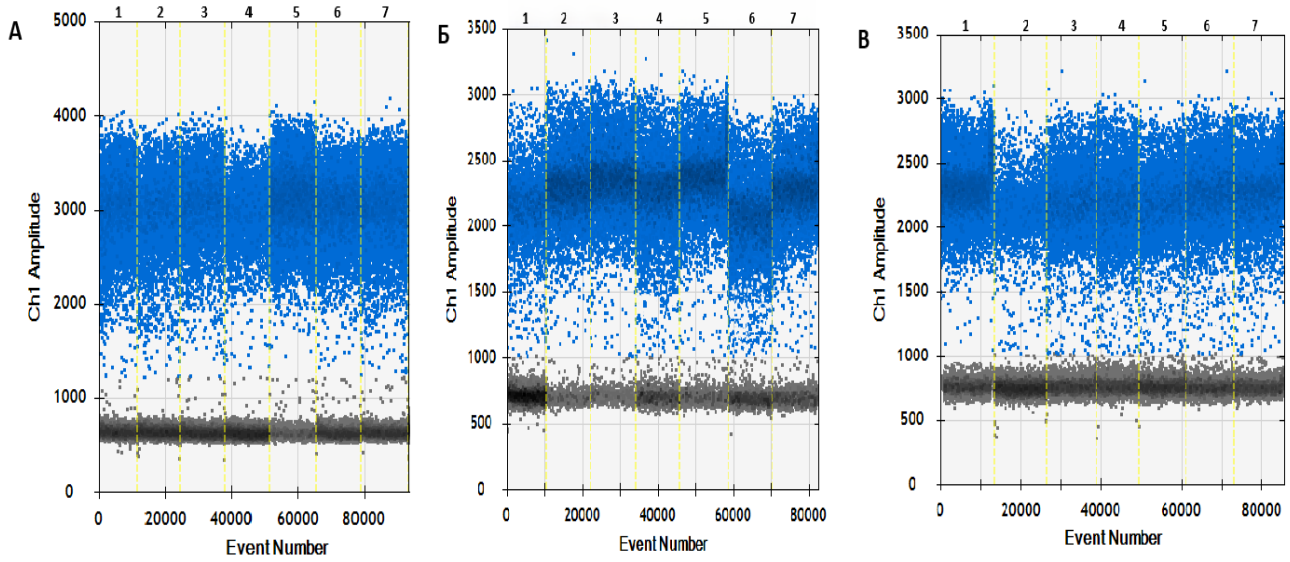
2024]. Учитывая эти преимущества, метод находит все более широкое применение в различных областях геномных исследований. В настоящей работе была проведена разработка протокола цкПЦР для количественной оценки экспрессии генов *bfr, groEl* и *rpoH* у разных подвидов туляремийного микроба.

Для проверки оптимальной температуры отжига праймеров и зондов проводили термоградиентную постановку эксперимента, аналогичную той, что использовали для ОТ-ПЦР. Разницы в значениях данного параметра между методами не наблюдалось, поэтому программа амплификации осталась неизменной. Праймеры и зонды для оценки экспрессии генов использовали аналогичные (Таблица 5).

В ходе исследования было подтверждено, что оптимальной концентрацией кДНК в реакционной смеси для последующей амплификации методом цкПЦР является 100 нг.

Подобранные условия проведения ПЦР включали реакционный объём 20 мкл, содержащий 10 мкл ddPCR Supermix, 0.1 мкл каждого праймера (конечная концентрация 10 пМ/мкл), 0.03 мкл зонда (4 пМ/мкл), 1 мкл кДНК (100 нг/мкл) и деионизированную воду до конечного объёма. После завершения амплификации образцы анализировали с использованием автоматизированной системы QX200 Droplet Reader для детекции и количественной оценки образованных капель.

Количественный анализ целевых последовательностей ДНК выполняли с помощью программного обеспечения QuantaSoft, анализируя 1 мкл каждого образца (Рисунок 4). Критерием включения в анализ являлось наличие не менее 10000 детектированных капель на образец. Разделение капель на положительные и отрицательные проводили на основании порогового значения флуоресцентного сигнала. Абсолютные концентрации целевых ДНК-последовательностей и 95 % доверительные интервалы рассчитывали на основе Пуассоновского распределения, с использованием полученных экспериментальных данных.



1 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 2 – *F. tularensis* КМ-9(Cap$^-$); 3 – *F. tularensis* Utah 112; 4 – *F. tularensis* 503/840; 5 – *F. tularensis* Kosho; 6 – *F. tularensis* A61; 7 – *F. tularensis* B399 A-Cole

Рисунок 4 – График разделения положительных (синие) и отрицательных (черные) капель в пробах бактериальных суспензий *F. tularensis* разных подвидов методом цкПЦР с исследуемыми праймерами и зондами

Таким образом, в главе 3 были разработаны методы детекции экспрессии стресс-генов туляремийного микроба. Для решения этой задачи были оптимизированы условия проведения ОТ-ПЦР и цкПЦР для количественной оценки экспрессии генов *bfr, groEl, rpoH*, подобраны специфические праймеры и зонды, определены температурные параметры и оптимальные концентрации матрицы. Проведенные исследования подтвердили специфичность разработанных методов в отношении различных подвидов *F. tularensis*.

ГЛАВА 4 ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА В СТРЕСС-УСЛОВИЯХ

4.1 Экспериментальное обоснование возможности использования электрооптического анализа для мониторинга физиологического статуса *F. tularensis*

Электрооптический анализ бактериальных суспензий для оценки физиологического состояния клеток проводили на автоматизированной аналитической установке EloTrace. Жизнеспособность оценивали по изменениям в цитоплазме и цитоплазматической мембране, которые служат наиболее чувствительными индикаторами ответа на изменение внешних условий [Pauly H. et al., 1962]. Для определения электропроводности этих компонентов бактериальной клетки использовали частоты, коррелирующие с методом определения жизнеспособности на чашках Петри. Такими частотами оказались 900 кГц – для цитоплазмы, и 2100 кГц – для цитоплазматической мембраны, что соответствует литературным данным [Волошин А.Г. и др., 2017; Junne S. et al., 2010].

Для определения оптимального значения анизотропии поляризуемости (АП) компонентов клетки, измерения проводили на выращенной при температуре 37 ^{o}C бактериальной суспензии из 48-часовой агаровой культуры и 18-часовой бульонной культуры в состоянии покоя. Данные параметры культивирования, в дальнейшем, были использованы для сравнительного анализа с клетками, перенесшими стресс-условия. Для обеих частот оптимальные значения АП, соответствующие 100 % выживаемости, находились в диапазоне 81–200 усл. ед. (Таблица 9, Рисунок 5) Согласно литературным данным, изменения АП у поврежденных клеток возможны как в сторону возрастания данного показателя, так и его снижения. Превышение оптимальных значений электропроводности свидетельствует об остатке в них токсичных метаболитов, а падение значений ниже оптимума говорит об истощении и гибели клеток [Волошин А.Г. и др., 2017].

Таблица 9 – Корреляция показателей АП клеток и «жизнеспособность» культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Диапазон АП, усл. ед.		Жизнеспособность, %	Коэффициент корреляции Спирмена
900 кГц	2100 кГц		
0–20	0–20	0–10	0,82
21–80	21–80	25–70	0,94
81–200	81–200	71–100	0,96
>201	>201	0–10	0,8

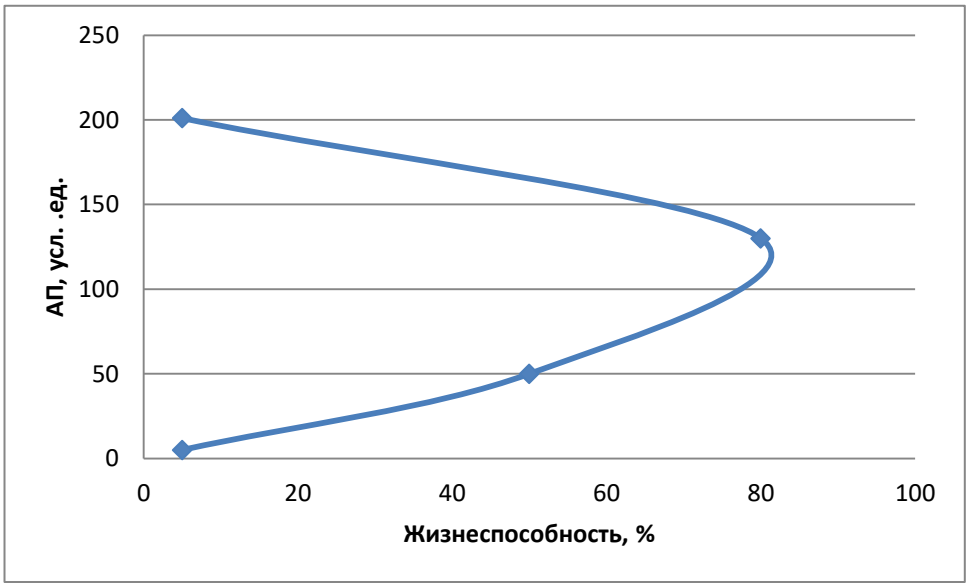


Рисунок 5 – Связь выживаемости с электропроводностью цитоплазмы

Как известно, *F. tularensis* насчитывает 4 подвида, которые имеют отличия по ряду фенотипических признаков: биохимической активности, степени патогенности для человека и животных, чувствительности к некоторым антибиотикам, а также имеют особенности экологии и ареала обитания. В связи с этим было выдвинуто предположение, что показатели АП, также будут иметь отличия между подвидами. Измерения электропроводности у штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* проводили в тех же условиях, что и у вакцинного штамма. Показано, что у всех штаммов туляремийного микроба диа-

пазоны АП совпадали с определенными ранее для *F. tularensis* 15 НИИЭГ и также коррелировали с показателями жизнеспособности (Таблица 10).

Таблица 10 – Показатели АП разных подвидов туляремийного микроба и их жизнеспособности

Штамм	Средний показатель АП при культивировании в нормальных условиях		Жизнеспособность при определении чашечным методом, %
	900 кГц	2100 кГц	
F. tularensis subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^-)	185±7,25	165±22,2	86±4,5
F. tularensis subsp. *holarctica* биовар *japonica* Kosho	96±4,32	85±3,5	75±3,8
F. tularensis subsp. *tularensis* B399A-Cole	128±3,55	104±4,1	79±6,4
F. tularensis subsp. *novicida* Utah 112	106±11,2	102±7,8	84±5,2
F. tularensis subsp. *holarctica* КМ-3 (21-Л)	181±15,26	130±4,1	85±6,6
F. tularensis subsp. *holarctica* 503/840	136±9,15	122±7,5	97±9,5
F. tularensis subsp. *mediasiatica* A61 (117)	190±9,1	192±8,9	91±8,4

Для всех исследованных штаммов была установлена значимая корреляция между изменениями АП и показателями жизнеспособности клеток. Наибольшая корреляция наблюдалась при измерениях на частоте 2100 кГц ($r_S \approx 0,9$; $p < 0,05$). Хотя на частоте 900 кГц также регистрировалась высокая степень связи, для бескапсульного штамма *F. tularensis* КМ-9 (Cap^-) на этой частоте корреляционная зависимость отсутствовала. Подобная реакция, по-видимому, отражает специфику цитоплазматической организации бескапсульного штамма, проявляющуюся в измененной чувствительности к факторам среды и, как следствие, в модифицированном ответе.

Таким образом, установленные диапазоны аналитического параметра и рабочих частот применимы для всех исследованных штаммов *F. tularensis*

независимо от их подвидовой принадлежности. Возможность мониторинга в режиме реального времени подтверждает перспективность метода для оптимизации условий культивирования туляремийного микроба в экспериментальных исследованиях.

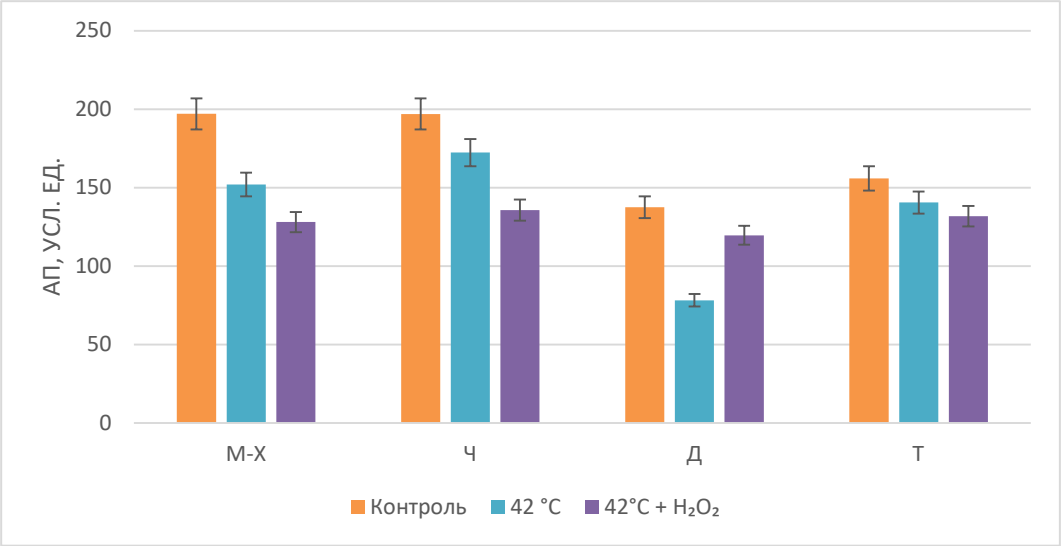
4.2 Применение электрооптического анализа при исследовании стресс-воздействия на модели вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Как известно, на состояние бактериальной клетки влияет большое количество факторов, в том числе и состав питательной среды. Отсутствие необходимых факторов роста в субстрате может привести к гибели микроорганизма, а также изменить профиль продуцируемых белков [Lyamin A.V. et al., 2023].

В эксперименте использовалось четыре питательных среды: две простые – среда Чемберлена (Ч) и бульон Мюллера-Хинтона (М-Х), и две сложные – Т-бульон (Т) и Д-бульон (Д). Выбор данных сред обусловлен их различающимся составом и направлением использования (Таблица 3).

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера (объём колб 250 мл, объем среды 25 мл) на шейкере-инкубаторе «Multitron II» (Infors, США) 200 об./мин. в течение 16 ч при температуре 37±2 ^{o}C до достижения OD_{600} = 0,5–0,6 (экспоненциальная фаза роста), после чего добавляли H_2O_2 до конечной концентрации 5 мМ, повышали температуру выращивания до 42 ^{o}C и культивировали еще в течение 2 ч. Контрольные образцы выращивали без перекиси водорода при температуре 37±2 ^{o}C. По истечении двух часов производилось измерение АП. Показано, что неблагоприятные условия снижают жизнеспособность *F. tularensis* 15 НИИЭГ, независимо от питательной среды и приводят к изменениям ориентационного спектра клеток (Рисунок 6). Наименьшая разница между контролем и опытом наблюдалась в Т-бульоне. Так как данная среда является сложной и специализированной для выращивания туляремии, можно сказать, что воздействие стресс-условий было нивелировано

составными элементами данной питательной среды.



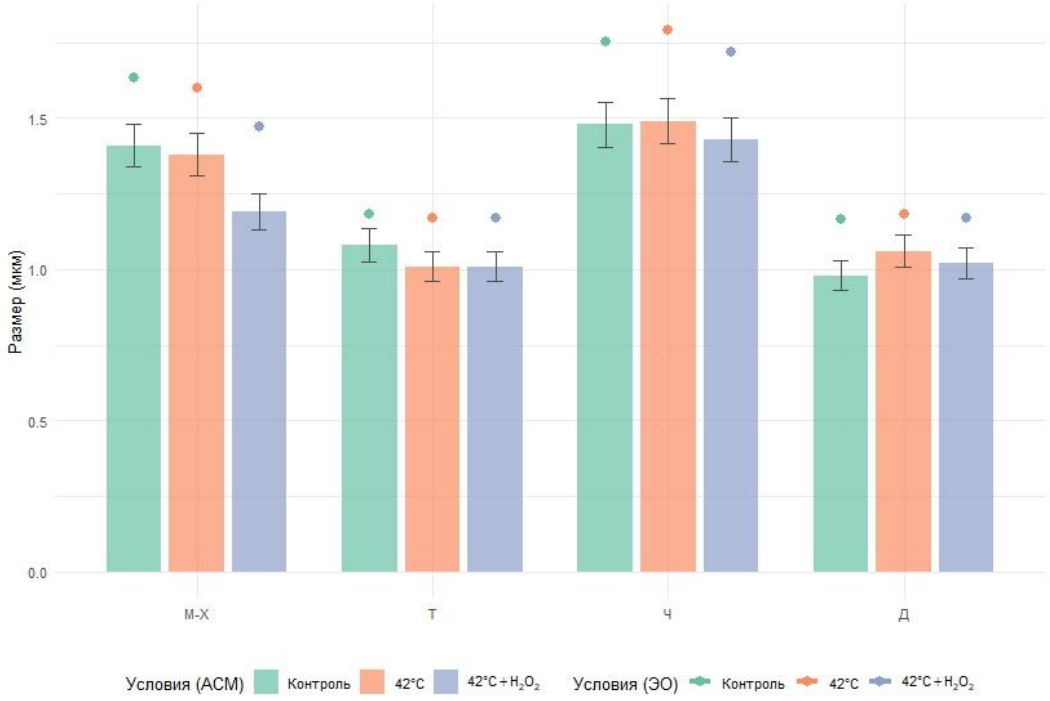
Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 6 – Анизотропия поляризуемости (АП) на частоте 900 кГц клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ при выращивании в условиях стресса в различных средах

При сравнении контрольных показателей можно наблюдать максимальную анизотропию в среде Мюллера-Хинтона. В этом случае жизнеспособность клеток была максимальна относительно этого показателя для других сред. Это говорит о том, что состав данной питательной среды наиболее оптимален для выращивания микробной биомассы. Тем не менее, стрессовые условия снижают жизнеспособность в данной среде на 30 %, что гораздо больше, чем в остальных средах.

Было исследовано изменение размеров клеток в зависимости от использования различных сред и стрессовых условий. Указанный параметр регистрировали методом электрооптического анализа, а для верификации результатов применяли данные атомно-силовой микроскопии. Отмечено, что коэффициент корреляции Спирмена между этими методами составил 0,9 ($p < 0,05$). Показано, что в Д-бульоне и среде Чемберлена повышение температуры приводило к увеличению среднего размера клеток на 6±1 %. В Д-бульоне комбинация повышенной температуры и добавления перекиси

водорода также приводила к увеличению размера клеток, но уже на 10 %. Это связано с усилением синтеза капсульного вещества (Рисунок 7).



Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 7. Сравнительная характеристика размеров клеток туляремийного микроба в разных условиях методом АСМ и ЭО анализа

Повышение температуры до 42 °С в сочетании с пероксидом водорода в концентрации 5 мМ/л в среде Мюллера-Хинтона приводило к уменьшению размера клеток в среднем на 10 %. В данных условиях угнетается работа клеточных структур, что в дальнейшем приводит к гибели клеток. В Т-бульоне значительных изменений размера клетки не наблюдалось. Скорее всего, это связано с тем, что Т-бульон на основе сердечно-мозговой вытяжки нивелировал вредное воздействие на структуру клетки.

Таким образом, применение электрооптического анализа для изучения стресс-воздействия на вакцинный штамм *F. tularensis* позволяет с высокой точностью оценивать изменения бактериальных клеток в реальном времени. Этот метод

дает возможность количественно оценить степень повреждения клеток, что критически важно для контроля стабильности вакцинного штамма при различных условиях культивирования.

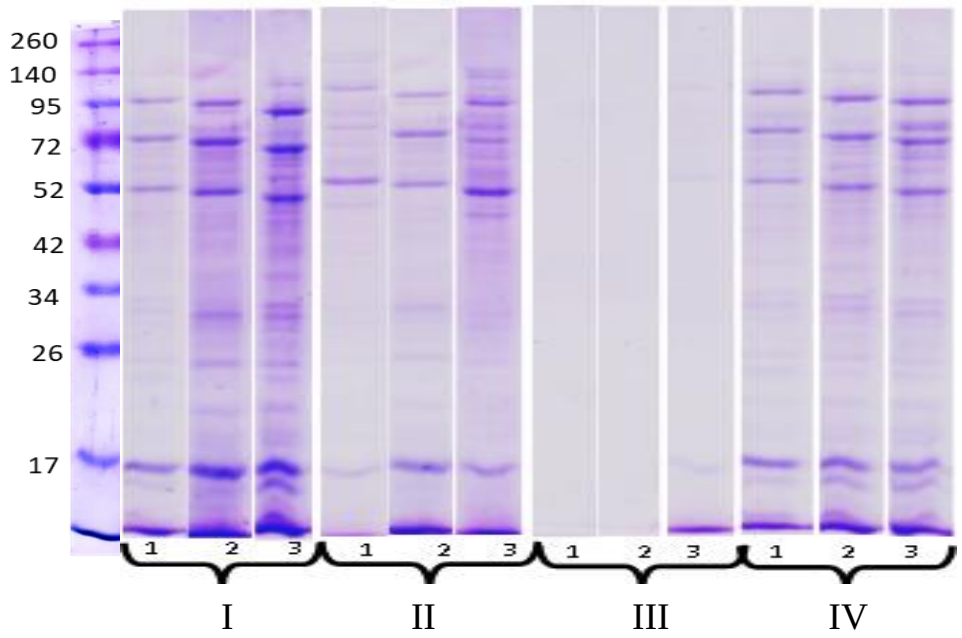
ГЛАВА 5 ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕКРЕТИРУЕМЫХ СТРЕСС-БЕЛКОВ

Одним из ключевых факторов вирулентности *F. tularensis* являются белки, участвующие во взаимодействии с иммунной системой хозяина и обеспечении выживания бактерии в неблагоприятных условиях [Ericsson M. et al., 1994]. Поэтому изучение и последующая характеристика данных антигенов представляет актуальную научную задачу. В настоящей главе описывается метод получения экскретируемых стресс-белков *F. tularensis*, таких как Bfr, GroEl/GroEs и HSP, которые являются важными компонентами системы защиты бактерии от стресса. Выделение и характеристика данных белков позволят получить сведения, которые внесут существенный вклад в исследование молекулярных механизмов взаимодействия *F. tularensis* с иммунной системой хозяина, что имеет принципиальное значение для разработки перспективных терапевтических стратегий, а также новых диагностических систем.

5.1 Оптимизация условий культивирования для синтеза экскретируемых стресс-белков Bfr, GroEl/GroEs и HSP

В ходе эксперимента проведено комплексное исследование белковых профилей культуральной жидкости вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенного на различных питательных средах в стандартных и стрессовых условиях. Сравнительный анализ секреторной активности микроорганизма проводили на четырех средах: Т-бульоне, бульоне Мюллера-Хинтона, среде Чемберлена и Д-бульоне. Установлено, что при культивировании на первых трех средах возбудитель туляремии секретирует стабильный набор из 12 белков как в контрольных условиях, так и при воздействии стресс-факторов. SDS-PAGE анализ продемонстрировал, что термический стресс (42 °C в течение 2 ч) достоверно увеличивает интенсивность секреции стресс-белков. Среди идентифицированных белков особое значение имеют четыре молекулярных шаперона: GroEl (60 кДа),

GroEs (10 кДа), DnaK (75 кДа) и Bfr (17 кДа), выполняющие ключевые функции в системе стресс-ответа бактерий. Комбинированное воздействие окислительного стресса (5 мМ H_2O_2) и повышенной температуры (42 °С) приводило не только к усилению синтеза указанных стресс-белков, но и к появлению дополнительных белковых фракций в электрофореграмме (Рисунок 8).



I – среда Мюллера-Хинтона; II – среда Чемберлена; III – Д-бульон; IV – Т-бульон. 1 – контроль, без стрессового воздействия, 2 –повышение температуры выращивания до 42 °С на 2ч; 3 – повышение температуры выращивания до 42 °С на 2 ч и добавление 5 мМ H_2O_2.

Рисунок 8 – Результаты SDS-PAGE белков, секретируемых бактериями *F. tularensis* 15НИИЭГ при выращивании на жидких питательных средах

В отличие от других исследованных сред, при культивировании на Д-бульоне секреция белков *F. tularensis* наблюдалась только при комбинированном стрессовом воздействии (окислительный и температурный стресс), где количество детектируемых белковых фракций не превышало трех. Данный эффект может быть обусловлен высоким содержанием $FeSO_4$ в составе среды. Хотя ионы Fe^{2+} необходимы для выживания возбудителя в организме хозяина, участвуя в метаболических процессах и системе сидерофорного транспорта [Ramakrishnan G.

et al., 2017], их избыток в питательной среде приводит к активации реакции Фентона. Образующиеся гидроксильные радикалы вызывают окислительное повреждение клеточных структур, что объясняет ограниченную секреторную активность бактерий. В этих условиях наблюдается повышенная экспрессия бактериоферритина (Bfr) – ключевого белка, регулирующего гомеостаз железа и защищающего клетку от окислительного стресса [Fletcher J.R. et al., 2018].

Полученные результаты демонстрируют определяющее влияние состава питательной среды на характер стресс-ответа у *F. tularensis*. Сравнительный анализ показал, что бульон Мюллера-Хинтона является оптимальной средой для культивирования возбудителя туляремии при изучении секреции стресс-белков. При использовании данной среды наблюдалась максимальная продукция экскретируемых антигенов в условиях окислительного и температурного стресса при сохранении жизнеспособности бактериальных клеток на уровне, достаточном для поддержания метаболической активности.

5.2 Разработка протокола очистки экскретируемых стресс-белков (GroEl/GroEs, Bfr, HSP) из супернатанта бактериальной культуры

Для получения экскретируемых стресс-белков *F. tularensis* в качестве штамма-продуцента использовали *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Двухсуточную культуру, выращенную на FT-агаре, суспендировали в 0,9 % растворе NaCl и инокулировали в жидкую среду Мюллера-Хинтона до достижения OD_{565} = 0,5–0,6 единиц Мак-Фарланда, что соответствует 5×10^8 м.к./мл. После этого, колбы с культурой переносили в термостатируемый шейкер-инкубатор, где культивировали до ранней стационарной фазы в течение 18–20 ч при температуре 37 ^oC до концентрации 3×10^9 м.к./мл.

Для активации выхода стресс-белков в культуральную жидкость добавляли 38 % H_2O_2 до конечной концентрации 5мМ/л и повышали температуру до 42 ^oC на 2 ч, под контролем электрооптического анализатора. Для успешного выхода стресс-белков значения АП в процессе стрессирования не должны снижаться ни-

же 80 ед.

По окончании воздействия стресс-условий культуральную жидкость освобождали от клеточной массы методом стерилизующей фильтрации с использованием микрофильтрационной ячейки Vivaflow 200 с размером пор 0,2 мкм. Стерильный фильтрат собирали в отдельную стерильную емкость.

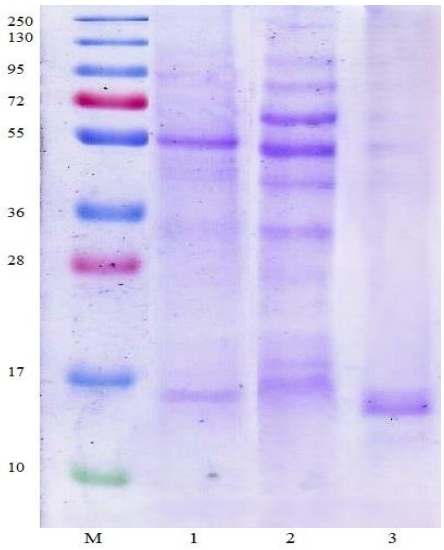
После подтверждения специфической стерильности фильтрата методом микробиологического контроля проводили фракционное осаждение белков сульфатом аммония при различной степени насыщения: 55 % для Bfr, 70 % для GroEl/GroEs и 90 % для HSP, где концентрации были подобраны экспериментально на основании предварительных исследований. После инкубации (1 ч при комнатной температуре с перемешиванием либо ночь при 4±1 °C) осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 40 мин. Освобождение от соли проводили путем диализа против 0,05М Трис-HCl с 10мМ ЭДТА со сменой раствора до полного избавления от сульфата аммония.

На следующем этапе фракцию получаемого белка очищали путем гельхроматографии на носителе Сефадекс S-300. Элюция проходила с постоянной скоростью (0,3 мл/мин) при комнатной температуре. В качестве элюирующего буфера использовался 0,05М Трис-HCl с добавлением 10 мМ ЭДТА. Контроль хроматографии проводили фотометрически, при длине волны 280 нм. Фракции первого (для Bfr) или второго (для GroEl/GroEs и HSP) пика объединяли и концентрировали с использованием концентраторов центрифужных VivaSpin 20 с диаметром пор 10 кДа.

Для дальнейшей очистки антигенов Bfr и GroEl/GroEs применяли ионообменную хроматографию на колонке с DEAE-Sepharose, предварительно уравновешенную 0,05 М Трис-HCl буфером (pH 8,0±0,2), содержащим 1 мМ ЭДТА. Как Bfr, так и GroEl/GroEs выделяются при 300 мМ NaCl.

Данная методика позволила выделить очищенные антигены *F. tularensis* (Рисунок 9). По данным SDS-PAGE по U.K. Laemmli, белковые препараты имеют следующие молекулярные массы: Bfr – 17кДа, GroEl/GroEs – 57/10 кДа. HSP име-

ет в своем составе 5 мажорных полос с молекулярными массами от 10 до 90 кДа.



M – маркеры молекулярной массы 11–250 кДа («Fermentas», США); 1 – GroEl/GroEs; 2 – HSP; 3 – Bfr

Рисунок 9 – Электрофореграмма (SDS-PAGE) секретируемых стресс-белков *F. tularensis* 15 НИИЭГ

5.3 Характеристика экскретируемых стресс-белков (GroEl/GroEs, Bfr, HSP) туляремийного микроба

Результаты сравнительного анализа демонстрируют значительные различия химического состава исследуемых антигенов. При исходной концентрации белка 1 мг/мл относительное содержание углеводов варьировало в зависимости от типа антигена: в образце Bfr оно составляло 3 %, в GroEl/GroEs – 15,6 %, а в HSP достигало 32,5 %. Особый интерес представляло распределение липидных компонентов: в белках GroEl/GroEs и Bfr липиды не были обнаружены, тогда как в HSP их содержание составило 13,5 % от общей массы. Присутствие нуклеиновых кислот в образцах обнаружить не удалось. Полученные данные демонстрируют существенные различия у антигенов по соотношению углеводных и липидных компонентов. Эти результаты могут быть значимы для понимания структурно-функциональных особенностей исследуемых белков.

Иммунохимическую активность исследованных антигенов оценивали методами дот-иммуноанализа (ДИА) и иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием КТС (Таблица 11). Результаты продемонстрировали их специфическое взаимодействие с антителами в обеих аналитических системах, что подтверждает их диагностическую ценность.

Таблица 11 – Состав и иммунохимические свойства антигенов *F. tularensis* 15НИИЭГ

Антиген	Химический состав, %			Активность, мкг/мл	
	Белки	Углеводы	Липиды	ДИА	ИФА
Bfr	97±0,6	3±0,7	0	1,95±1,1	0,97±0,3
GroEl/ GroEs	84,4±1,2	15,6±2,2	0	2,23±1,6	1,97±1,2
HSP	54±6,4	32,5±4,1	13,5±1,8	1,85±0,9	1,9±0,4

При оценке стабильности исследуемых антигенов изучались их характеристики после нагревания на нескольких температурных режимах: 45±1 ^{o}C, 65±1 ^{o}C, 85±1 ^{o}C. В качестве контроля использовали температуру 25±1 ^{o}C. Исследования проводились методом иммуноферментного анализа. Антигены, предварительно обработанные повышенными температурами в течение 15 мин, сенсибилизировали на поверхности планшета в концентрациях от 50 до 1 мкг/мл. В качестве конъюгата использовали сыворотку коммерческую туляремийную в рабочем разведении 1/1000. Показано, что наиболее стабильными препаратами являются комплекс HSP, и GroEl/GroEs, их активность не изменялась даже при повышении температуры до 85 ^{o}C. Для Bfr наблюдалось снижение активности при максимальном нагреве в данном эксперименте (Таблица 12).

Таблица 12 – Иммунохимическая активность антигенов при изменении условий хранения

Температура	Bfr, мкг/мл	GroEl/GroEs, мкг/мл	HSP, мкг/мл
Контроль (25 °C)	0,97±0,3	1,97±1,2	1,9±0,4
45 °C	1,2±0,6	2,2±1,0	2,3 ±0,9
65 °C	2,3±1,4	2,4±0,4	2,1±1,0
85 °C	15,5±5,8	1,2±0,7	1,8±0,6

Помимо иммунохимической активности наблюдались изменения эмиссии (испускание светового потока) у растворов антигенов после инкубации при повышенной температуре (Таблица 13).

Таблица 13 – Показатели флуоресценции триптофана при изменении температуры хранения антигенов

Температура, °C	Bfr		GroEl/GroEs		HSP	
	Em, нм	h пика, усл. ед.	Em, нм	h пика, усл. ед.	Em, нм	h пика, усл. ед.
25	350	170	346	374	335	140
45	351	172	346	374	327	140
65	350	192,2	343	374	312	160
85	350	228	343	374	309	174

Можно отметить, что показатели эмиссии ($\lambda_{возб}$ = 286 нм, $\lambda_{эмис}$ = 300–350 нм) у Bfr и GroEl/GroEs остаются неизменными. Это указывает на сохранение окружения триптофановых остатков и жесткой структуре этих белков [Горохов В.В. и др., 2021]. У HSP наблюдался постепенное смещение в синюю область спектра до 309 нм. Такой сдвиг свидетельствует об уплотнении белковой структуры [Горохов В.В. и др., 2021]. Увеличение интенсивности флюоресценции свидетельствует об освобождении триптофана, следовательно, о конформационных перестройках белковых молекул [Khrustalev V.V. et al., 2021]. Активнее всего она возрастала у Bfr, что может быть связано с частичной экспозицией триптофановых остатков в результате тепловой денатурации. Сопоставляя данные флуорометрии с результа-

тами иммуноферментного анализа, было сделано предположение, что только Bfr является термолабильным белком, поскольку теряет свою активность при нагреве выше температуры 85 °С.

Иммунобиологические свойства

Оценку токсичности препаратов антигенов HSP, GroEL/GroES и Bfr проводили в тестах *in vivo* на мышах и морских свинках. Животным вводили препараты внутрибрюшинно (мыши) или подкожно (морские свинки) в дозах 100 и 1000 мкг соответственно. Контрольные группы получали эквивалентный объем стерильного 0,9% раствора NaCl (pH 7,2). У опытных групп животных не было зарегистрировано снижения веса, а также местных реакций (гиперемия, инфильтрат) в области введения препаратов. Таким образом, все исследованные стресс-белки продемонстрировали отсутствие токсичности и безвредность для лабораторных животных.

С целью оценки потенциального иммунотоксического действия исследуемых антигенов проанализировано их влияние на показатели клеточного иммунитета. Изменения в клеточном звене способны вызывать нарушения иммунного ответа, что может приводить к неполноценному специфическому ответу на вакцинацию.

Установлено, что белок Bfr индуцирует наиболее сбалансированный иммунный ответ, характеризующийся минимальным уровнем апоптоза (2,5–4,3 %; $p < 0,05$ по сравнению с контролем на 21–30 сутки) при сохранении высокой пролиферативной активности (21,7–27,3 %; $p < 0,05$). Соотношение апоптоз/пролиферация для Bfr сохранялось на низком уровне (0,10–0,18), статистически значимо отличаясь от других групп на 21-е и 30-е сутки ($p < 0,05$).

В отличие от Bfr, препарат GroEL/GroEs вызывал выраженный иммунный ответ с пиком апоптоза на 21-е сутки (8,2±0,49 %; $p < 0,05$), что сопровождалось значительным подавлением пролиферации (12,3±1,24 %; $p < 0,05$). К 30-м суткам отмечалось частичное восстановление пролиферативной активности (21,9±0,4 %), однако уровень апоптоза оставался повышенным (6,5±0,88 %; $p < 0,05$). Антиген

HSP демонстрировал стабильные показатели апоптоза (3,8–5,0 %) и увеличение пролиферации к 30-м суткам (23,8±0,68 %; $p < 0,05$).

Анализ лейкоцитолиза показал схожую динамику для всех препаратов с пиком реакции на 14-е сутки для всех антигенов: Bfr (42,8 %), HSP (38,1 %), GroEL/GroEs (23,8 %). К 30-м суткам сохранялся статистически значимый уровень лейкоцитолиза в группе животных, иммунизированных HSP (25,4 %; $p < 0,05$), что свидетельствует о способности данного антигена индуцировать продолжительный иммунный ответ.

Таблица 14 – Динамика клеточного цикла спленоцитов морских свинок под действием туляремийных антигенов в ходе иммуногенеза

Препарат	Сроки иммуногенеза, сутки	Апоптотические клетки (M±m), %	Пролиферирующие клетки (M±m), %	Соотношение числа клеток на стадии апоптоза и пролиферации	Лейкоцитолиз, %
Bfr	7	4,3±0,96	24,4±1,24	0,18	10
	14	4,0±0,62	27,3±1,99	0,18	42,8
	21	2,5±0,75	24,6±1,46	0,1	15,3
	30	2,6±0,07	21,7±0,99	0,1	12,5
GroEl/ GroEs	7	5,8±0,64	18,5±0,75	0,31	11,4
	14	4,6±0,46	25,1±1,08	0,18	23,8
	21	8,2±0,49	12,3±1,24	0,07	12,2
	30	6,5±0,88	21,9±0,4	0,3	9,6
HSP	7	4,8±0,13	16,9±0,51	0,28	9,7
	14	5,0±0,66	18,3±1,26	0,27	38,09
	21	3,8±0,09	18,7±1,37	0,2	16,8
	30	4,9±0,31	23,8±0,68	0,21	25,4
Контроль	–	2,7±0,29	15,4±2,22	0,17	12,6

Таким образом, сочетание низких коэффициентов апоптоз/пролиферация и длительно сохраняющегося лейкоцитолиза делает исследуемые антигены перспективными кандидатами для разработки вакцинных препаратов против туляремии.

Анализ протективных свойств стресс-белков *F. tularensis* на модели мышей линии BALB/c показал, что однократная иммунизация обеспечивает защиту при подкожном заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840. Значения ED_{50} составили: для HSP — 46 мкг, для GroEl/GroEs — 31 мкг, для Bfr — 15,7 мкг. Индекс иммунитета был равен 232, 158 и 72,5 соответственно. При оценке влияния на выживаемость мышей, иммунизированных однократно каждым антигеном (HSP, Bfr, GroEl/GroEs) в дозе 20 мкг, все исследуемые белки показали выраженный защитный эффект. После контрольного заражения на 21-е сутки *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 (доза 100 м.к., LD_{50} = 1 м.к.) в группе иммунизированных животных наблюдалась достоверно более высокая выживаемость (свыше 50 % в течение эксперимента), тогда как в контрольной группе регистрировалась 100 % гибель на 6–8-е сутки (Рисунок 10).

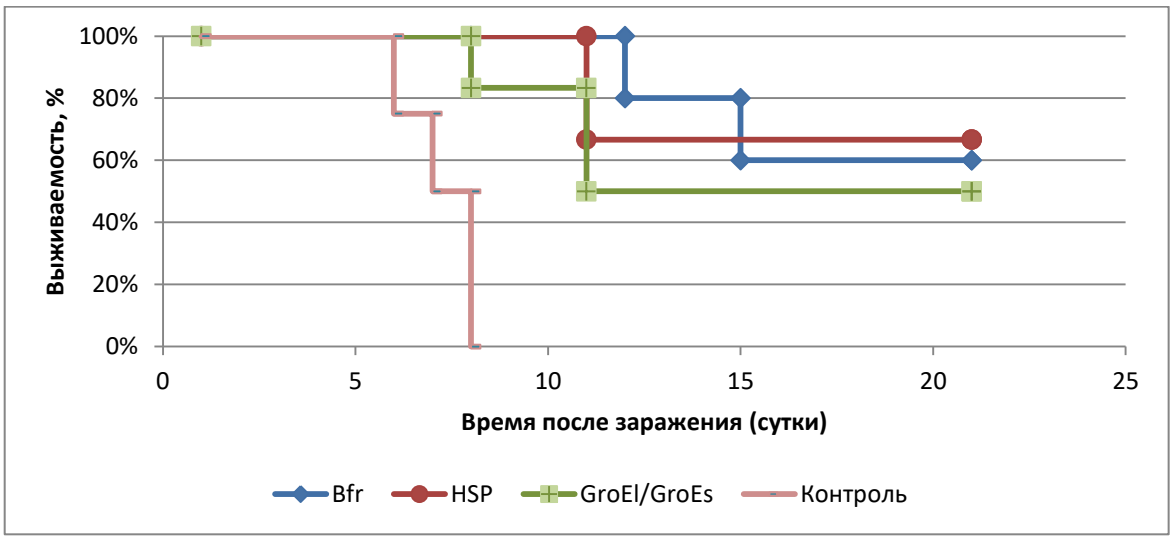


Рисунок 10 – Выживаемость белых мышей, иммунизированных стресс-белками туляремийного микроба, после заражения 100 м.к. вирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840

Для оценки напряжённости постинфекционного и поствакцинального иммунитета против туляремии в практике лабораторной диагностики широко применяется определение титра специфических антител к возбудителю в сыворотке крови. В рамках данного исследования проведен эксперимент по детекции специ-

фических антител к *F. tularensis* в сыворотках переболевших и вакцинированных лабораторных животных (мыши, морские свинки).

В работе использовали чистые стресс-белки (Bfr, GroEl/GroEs и HSP) вакцинного штамма *F. tularensis*. Учитывая данные литературы о повышенном уровне специфических IgG в сыворотках больных и вакцинированных животных, для анализа применили твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) [Güler E. et al., 2024]. Планшеты для ИФА сенсибилизировали указанными антигенами в концентрации 20 мкг/мл.

Данные, представленные в таблице 15, демонстрируют отсутствие специфического антительного ответа на белок Bfr у лабораторных животных при всех схемах иммунизации живой туляремийной вакциной (ЖТВ), что свидетельствует, вероятно, о его ограниченной доступности в составе цельноклеточного вакцинного препарата. В отличие от вакцинации, инфекционный процесс с заражением диким штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 приводил к повышению титра антител к Bfr (1/20; $p < 0,05$), что указывает на возможность экспрессии данного антигена *in vivo* при развитии естественной инфекции.

Для стресс-белков HSP и GroEL/GroES был характерен активный антительный ответ во всех исследованных группах животных ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), подтверждающий их активное участие в иммуногенезе. Установлено влияние дозы и схемы введения вакцины на уровень иммунного ответа: двукратная иммунизация биомоделей высокими дозами ЖТВ повышала титры к HSP и GroEL/GroES в 2–4 раза ($p < 0,05$), тогда как низкие дозы вакцины (10^2–10^3 м.к.) индуцировали слабую ответную реакцию.

Ревакцинация и перенесенная инфекция усиливали иммунный ответ, что подтверждалось устойчивыми титрами антител ко всем исследуемым антигенам у переболевших морских свинок ($p < 0,05$ по сравнению с группой однократной иммунизации). Формирование долговременной иммунной памяти при естественной инфекции, вероятно, связано с пролонгированной экспозицией антигенов, комплексной активацией врожденного иммунитета и поликлональной стимуляци-

ей. В отличие от инфекции, вакцинные препараты, особенно субъединичные, могут провоцировать менее интенсивный и продолжительный иммунный ответ вследствие ограниченного набора антигенов и меньшей продолжительности их презентации иммунной системе [Murphy K.M. et al., 2017].

Таблица 15 – Титры специфических антител к антигенам *F. tularensis* в сыворотках вакцинированных и переболевших животных.

Биомодель	Схема иммунизации / заражения	Время забора крови (сутки)	Титр антител к антигенам *F. tularensis*		
			Bfr	HSP	GroEl/ GroEs
Белые мыши	Однократно, ЖТВ в дозе 200 м.к. п/к.	10	отриц.	1/160	1/160
	Двукратно, ЖТВ в дозе 5×10^5 м.к., п/к.	20	отриц.	1/320	1/640
	Двукратно, ЖТВ: первая доза 100 м.к., ревакцинация через 21 день 10^7 м.к., п/к.	20	отриц.	1/160	1/160
	Однократно, ЖТВ – 10^5 м.к., п/к.	20	отриц.	1/320	1/640
	Нормальная сыворотка (К-)		отриц.	отриц.	отриц.
Морские свинки	Однократно, ЖТВ н/к, с последующим заражением *F. tularensis* 503/840 (10^2 м.к.).	21	1/20	1/640	1/640
	Переболевшие м/св, после заражения *F. tularensis* 503/840 в дозе 5 м.к.	21	1/20	1/320	1/320
	Однократно, ЖТВ – 10^3 м.к., п/к.	60	отриц.	1/160	1/80
	Нормальная сыворотка (К-)		отриц.	отриц.	отриц.

Результаты проведенного исследования подтверждают диагностическую ценность исследуемых стресс-белков *F. tularensis* в серодиагностике туляремийной инфекции и оценке поствакцинального иммунитета. Наиболее перспективными маркерами являются GroEl/GroEs и HSP.

Учитывая высокую иммунохимическую и иммуногенную активность исследуемых антигенов, их использовали для получения специфических антител. На

следующем этапе была разработана схема получения иммуноглобулинов и проведена характеристика иммунобиологических свойств полученных препаратов.

5.4 Получение поликлональных антител к стресс-белкам туляремийного микроба (GroEl/GroEs, Bfr, HSP)

Эффективность получения специфических гипериммунных сывороток в значительной степени определяется схемой иммунизации, которая должна гарантировать высокую активность препарата при экономном использовании антигена. В нашем исследовании была применена стратегия многократной иммунизации, направленная на поддержание стабильно высоких титров антител на протяжении длительного периода. Для взаимоусиливающего эффекта использовали комбинацию путей введения: подкожного, обеспечивающего депо антигена, и внутривенного, способствующего быстрому формированию мощного иммунного ответа. Рабочие дозы антигенов для каждого этапа были оптимизированы в ходе предварительных экспериментов.

Были разработаны две схемы иммунизации кроликов для получения экспериментальных поликлональных сывороток к антигенам туляремийного микроба (Таблица 16). В обеих схемах использовались антигены туляремийного микроба (Bfr, GroEl/GroEs, HSP), выделенные из культуральной жидкости. Продуцентом стресс-белков во всех случаях являлся вакцинный штамм туляремийного микроба *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ.

В качестве адъювантов были использованы частицы коллоидного золота, а также хитозановые частицы. Ранее была доказана высокая эффективность данных препаратов в повышении иммуногенеза [Дыкман Л.А. и др., 2010; Курашова С.С. и др., 2018].

Для получения хитозановых частиц (Cs) использовали 0,25 % раствор хитозана (молекулярная масса 200 кДа, степень деацетилирования 75–95 %), приготовленный в 2 % растворе уксусной кислоты с добавлением 1 % Твин-80. К 200 мл полученного раствора при постоянном перемешивании на магнитной мешалке

(скорость 500 об/мин) добавляли 3,5 мл 10 % раствора сульфата натрия со скоростью 1 мл/мин. Процесс проводили в течение 60±10 мин при температуре 22±2 °С. Образовавшуюся суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Осадок дважды отмывали деионизированной водой (объем 50 мл, центрифугирование при 5000 g, 5 мин), после чего проводили стерилизацию в 70 % этаноле в течение 30±10 мин. Окончательную очистку осуществляли повторным центрифугированием (10000 g, 10 мин) с последующим ресуспендированием в стерильном 0,9 % растворе NaCl. Процедура конъюгации хитозановых частиц с белками заключалась в инкубации 0,5 % раствора хитозана с антигенами в двукратной иммунизирующей дозе в течение 45 мин при постоянном перемешивании. Эффективность связывания определялась путем измерения свободного белка по Лоури в надосадочной жидкости после центрифугирования при 10000 g в течение 20 мин. Полученные конъюгаты использовали в работе, если коэффициент связывания был больше 85 % [Li X. et al., 2008].

Коллоидное золото (КЗ) с диаметром частиц 15 нм получали по стандартной методике [Киреев М.Н. и др., 2008]. «Золотое число» оказалось равным 8 мкг/мл. Для получения конъюгата антигенов с КЗ, к 1 мл раствора КЗ добавляли 3 мкл углекислого калия и 30 мкл антигенов в начальной концентрации 500 мкг/мл. Конечная концентрация антигенов в конъюгате составила 70 мкг/мл.

Таблица 16 – Схемы иммунизации кроликов стресс-белками туляремийного микроба

№ схемы	Цикл	Инъекция	Доза антигена, мг	Компонент	Способ введения антигена	Интервал, сут.	Суммарная доза антигена, мг	Применение адъюванта
1	I	1	0,07	А	п/к	14	0,021	Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) (1:1)
		2	0,07	А	п/к	14		
		3	0,07	А	п/к	14		
	II	4	0,3	А	в/м	14	1,3	–
		5	1,0	Б	п/к	–		–
	III	6	0,3	Б	в/в	10	0,3	–
2	I	1	0,5	В	п/к	10	1,0	0,5 % раствор хитозана (1:1)
		2	0,5	В	п/к	10		
	II	4	0,4	Г	в/в	14	1,2	–
		5	0,4	Г	в/в	5		
		6	0,4	Г	в/в	7		

Примечание:
Компонент А – жидкий препарат белка, меченый коллоидным золотом в концентрации 70 мкг/мл.
Компонент Б – жидкий препарат белка в концентрации 1 мг/мл.
Компонент В – жидкий препарат белка в концентрации 2 мг/мл.
Компонент Г – жидкий препарат белка в концентрации 1 мг/мл.

В ходе исследования было получено 6 видов поликлональных сывороток – по две для каждого антигена (Bfr, GroEl/GroEs и HSP), соответствующих двум схемам иммунизации. Для всех сывороток проводилось комплексное изучение иммунохимических характеристик, на основании чего были отобраны наиболее эффективные варианты для каждого из антигенов. Анализ показал, что для белков HSP и GroEl/GroEs оптимальными оказались сыворотки, полученные по схеме иммунизации №1, тогда как для Bfr наибольшую активность продемонстрировали сыворотки, выработанные по схеме №2. Ниже представлены данные по наиболее активным сывороткам (Таблица 17).

Таблица 17 – Основные характеристики экспериментальных сывороток к стресс-белкам туляремийного микроба

Показатель	Bfr	HSP	GroEl/GroEs
Содержание белка (мг/мл)	47,5	59	63,65
Титр в РДП	1/32	1/32	1/64
Активность в РНГА	1/2560	1/2560	1/5120

Из цельных гипериммунных сывороток были получены Ig Bfr, Ig GroEl/GroEs, Ig HSP, которые использовали далее. Чувствительность полученных иммуноглобулинов была проверена в ИФА на 10 штаммах *F. tularensis* разных подвидов и биоваров: *F. tularensis* subsp. *holarctica* (6 штаммов) в том числе бескапсульный штамм (КМ-9 Cap^-); *F. tularensis* subsp. *tularensis* (2 штамма); *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (1 штамм); *F. tularensis* subsp. *novicida* (1 штамм). Специфичность исследовали на панели из 11 штаммов гетерологичных микроорганизмов (*Y. pestis* – 2 штамма, *Y. pseudotuberculosis* – 1 штамм, *Sh. sonnei* – 2 штамма; *V. cholerae* – 3 штамма) (Таблица 18).

Таблица 18 – Сравнение активности препаратов поликлональных антител к стресс-белкам туляремийного микроба в ИФА.

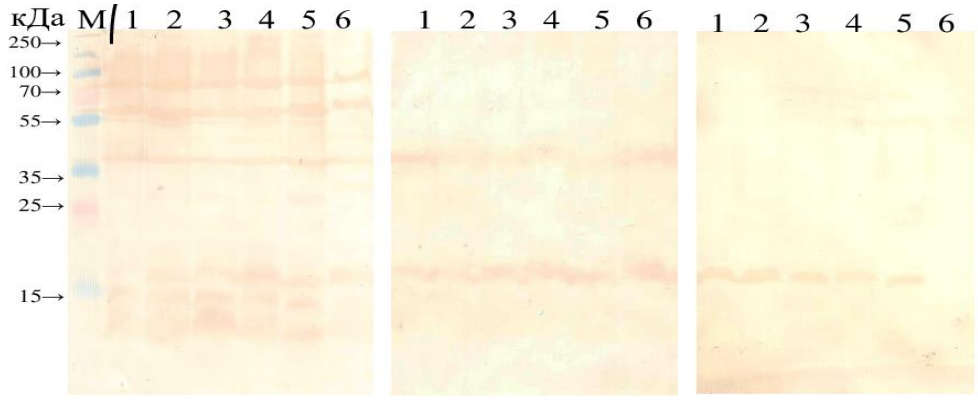
Штаммы	Чувствительность и специфичность ИФА, м.к./мл		
	Ig Bfr	Ig HSP	Ig GroEl/GroEs
F. tularensis subsp. *holarctica* 15НИИЭГ	$3{,}12\times10^{6}$	$1{,}25\times10^{7}$	$1{,}25\times10^{7}$
F. tularensis subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^{-})	$6{,}25\times10^{7}$	$1{,}25\times10^{7}$	$1{,}25\times10^{7}$
F. tularensis subsp. *holarctica* ery^{R} 503/840	$3{,}12\times10^{6}$	$6{,}25\times10^{6}$	5×10^{7}
F. tularensis subsp. *holarctica* ery^{S} КМ-3 (21 Л)	$3{,}12\times10^{6}$	$3{,}12\times10^{6}$	$2{,}5\times10^{7}$
F. tularensis subsp. *holarctica japonica* Kocho	$3{,}12\times10^{6}$	$1{,}25\times10^{7}$	5×10^{7}
F. tularensis subsp. *tularensis* B-399 A-Cole	$7{,}8\times10^{5}$	$6{,}25\times10^{6}$	$1{,}25\times10^{7}$
F. tularensis subsp. *tularensis* B-399 A-Cole Str^{R} 2500/k	$8{,}8\times10^{5}$	$6{,}25\times10^{6}$	$2{,}5\times10^{7}$
F. tularensis subsp. *mediasiatica* A-61 (117)	$1{,}56\times10^{6}$	$6{,}25\times10^{6}$	$2{,}5\times10^{7}$
F. tularensis subsp. *novicida* Utah 112	—	1×10^{8}	1×10^{8}
Y. pestis EV НИИЭГ	—	—	—
Y. pestis КМ 218	—	—	—
Y. pseudotuberculosis 31	—	—	—
Sh. sonnei 714	—	—	—
S. sonnei 37	—	—	—
V. cholerae O139	—	—	—
V. cholerae M818 Эльтор	—	—	—
V. cholerae M801 Огава	—	—	—

Проведенные исследования позволили установить высокую специфичность всех изученных антительных препаратов (Ig Bfr, Ig HSP, Ig GroEl/GroEs), что под-

тверждается полным отсутствием перекрестных реакций с представителями родов *Yersinia, Vibrio* и *Shigella* ($p < 0,001$). Наибольшая чувствительность (средняя детектируемая концентрация $3,12\times10^6$ м.к./мл) наблюдается для Ig Bfr. Ig HSP и Ig GroEl/GroEs демонстрируют сопоставимо высокую чувствительность, дополнительно выявляя штамм Utah 112 (1×10^8 м.к./мл). Данный феномен, вероятно, обусловлен особенностями *F. tularensis* subsp. *novicida*, который, согласно литературным данным, отличается от других подвидов структурной организацией и антигенной специфичностью [Kingry L.C. et. al., 2014].

Показано, что потеря капсулы (штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* KM-9 Cap^-) ассоциирована со снижением чувствительности к Ig Bfr ($6,25\times10^7$ м.к./мл; $p < 0,05$), что, предположительно, свидетельствует о влиянии капсульного полисахарида на доступность данного антигена.

Методом иммуноблоттинга с использованием специфичных поликлональных сывороток установлено, что исследуемые иммуноглобулины ко всем изучаемым антигенам специфически связываются с иммунодоминантными субъединицами препаратов независимо от подвидовой принадлежности штаммов, что подтверждает видовую специфичность данных антигенов (Рисунок 11). При этом выявлено, что Ig Bfr не детектирует белки штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, что коррелирует с результатами иммуноферментного анализа. Взаимодополняемость результатов, полученных независимыми методами (иммуноблоттинг и ИФА), подтверждает достоверность выявленной видовой специфичности.



HSP (Ig 1), GroEl/GroEs (Ig2), Bfr (Ig 3): 1 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840; 2 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* КМ-3 (21Л); 3 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовар *japonica* Kosho; 4– *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole; 5 – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 (117); 6 – *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112; M – маркеры молекулярной массы

Рисунок 11 – Результаты иммуноблоттинга лизатов *F. tularensis* разных подвидов с поликлональными антителами к стресс-белкам туляремийного микроба

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что поликлональные антитела к стресс-белкам вакцинного штамма туляремийного микроба обладают диагностической значимостью и позволяют идентифицировать наличие в пробах клеток *F. tularensis* различных подвидов.

Проведенные исследования позволили получить важные результаты по изучению экскретируемых стресс-белков *F. tularensis* – Bfr, GroEl/GroEs и HSP. Оптимизация условий культивирования на бульоне Мюллера-Хинтона с применением комбинированного стрессового воздействия (42 °C + 5 мМ H_2O_2) обеспечила максимальную продукцию целевых белков. Разработанный многоступенчатый протокол очистки, позволил получить высокоочищенные препараты с сохраненной биологической активностью.

Результаты исследования антигенных свойств показали, что все изучаемые белки не оказывают токсического действия на лабораторных животных и не нарушают нормальное течение иммунных процессов. При этом каждый антиген

продемонстрировал уникальные биологические характеристики. Bfr проявил себя как ключевой компонент антиоксидантной защиты, демонстрируя высокую протективную активность *in vivo*, несмотря на частичную термолабильность. Белковый комплекс GroEl/GroEs выделялся исключительной структурной стабильностью, сохраняя полную иммунохимическую активность даже при экстремальных температурах (85 °C), а также показывая наиболее выраженные иммуногенные свойства. Особый интерес представляет белок HSP, который благодаря уникальному химическому составу с высоким содержанием углеводных и липидных компонентов обеспечивал пролонгированный иммунный ответ, поддерживая детектируемый уровень специфических антител в течение 30 суток после иммунизации.

Полученные результаты не только углубляют понимание молекулярных механизмов стресс-адаптации *F. tularensis*, но и создают прочную основу для разработки новых поколений диагностических тест-систем и субъединичных вакцинных препаратов. Особую перспективу представляют GroEl/GroEs и HSP, которые благодаря своей стабильности и выраженной иммуногенности могут выступать в качестве ключевых компонентов современных иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики туляремии.

ГЛАВА 6 КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ *F. TULARENSIS* И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

6.1 Схема применения комплексного подхода к изучению функционального состояния туляремийного микроба

Получение экскретируемых антигенов *F. tularensis* в препаративных количествах представляет собой сложную многоэтапную задачу. Процесс требует строгого контроля на всех стадиях: за состоянием бактериальной культуры (ее необходимо поддерживать в фазе максимального роста, а применяемый стресс должен быть сублетальным для индукции синтеза целевых белков), а также за характеристиками самих антигенов после фильтрации (концентрация, иммуногенность). В связи с этим, для стандартизации и оптимизации получения высококачественных препаратов необходим комплексный подход, позволяющий одновременно отслеживать все ключевые параметры (Рисунок 12).

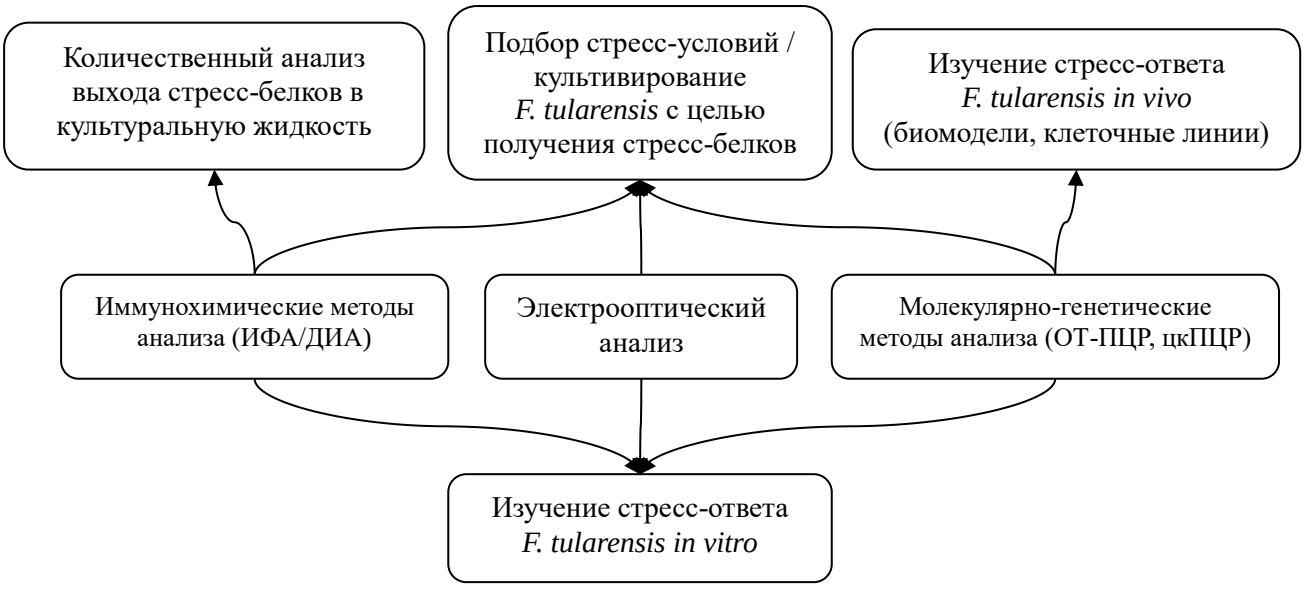


Рисунок 12 – Алгоритм комплексного подхода при изучении функционального состояния клеток туляремийного микроба и получения стресс-белков

В процессе культивирования проводится мониторинг ответа микроорганизма на стресс-условия с использованием электрооптического анализатора. Перед началом эксперимента оценивают исходное состояние культуры путем измерения её АП, поскольку данный показатель определяет общее состояние клеток, от чего будет зависеть их дальнейшая устойчивость к стресс-воздействию. Далее, после выхода бактериальной культуры в log-фазу, также под контролем электрооптического анализатора, на клетки воздействуют стрессирующим агентом. Важно, чтобы показатели жизнеспособности культуры не падали ниже критических значений. По окончании культивирования, культуральную жидкость отделяют от клеточной массы и методом ИФА или ДИА определяют иммунохимическую активность экскретируемых белков.

Методы ПЦР-анализа используют в том случае, когда идет подбор условий для получения того или иного экскретируемого белка, а также если нет возможности оценить стресс-воздействие на клетки другими методами, например при росте туляремийного микроба в макроорганизме. Их применение позволяет установить зависимость между стресс-воздействием и уровнем экспрессии генов стресс-белков, что дает возможность целенаправленно регулировать условия культивирования для индукции синтеза целевых антигенов и контроля их секреции.

6.2 Комплексная оценка стресс-ответа *F. tularensis in vitro* при моделировании условий макроорганизма (температурный и оксидативный стресс)

Как известно, *F. tularensis* способна инфицировать различные типы клеток, но у млекопитающих-хозяев размножается, преимущественно, в цитозоле инфицированных макрофагов. Для уничтожения бактериального агента просвет фагосомы сильно подкисляется (до pH ≈ 4,5), а также, образуются гидроксильные радикалы, которые обладают сильным биоцидным действием [Haas A., 2007]. Помимо этого, организм млекопитающего хозяина имеет повышенную температуру тела (до 42 ^{o}C), что также неблагоприятно влияет на бактериальные клетки. Тем не менее, туляремийный микроб, проникая в цитозоль клетки-хозяина, способен ак-

тивно реплицироваться [Celli J. et al., 2013].

Для противостояния стрессовой внутриклеточной среде, с которой она сталкивается во время своего распространения, *F. tularensis* имеет специальные механизмы устойчивости, в которых немаловажную роль играют стресс-белки.

В качестве стресса, имитирующего внутреннюю среду макрофагов, было использовано повышение температуры с 37 ^{o}C до 42 ^{o}C совместно с воздействием 5 мМ H_2O_2. Ранее в работе уже было показано успешное применение данных условий на модели вакцинного штамма туляремийного микроба.

Для изучения комплексного воздействия температуры и перекисного окисления нами использовались опробованные ранее методы: электрооптический анализ для контроля культуры на клеточном уровне, ОТ-ПЦР для контроля уровня экспрессии стресс-генов до и после стресс-воздействия, а также иммуноферментный анализ со специфическими сыворотками для определения уровня антигенов.

На первом этапе работа проводилась на вакцинном штамме *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, культивируемом в ферментере малого объема (1 л) на питательной среде Мюллера-Хинтона. Необходимо было определить момент времени, в который бактериальные клетки начинают реагировать на изменение условий. На рисунке 13 показаны АП бактериальной суспензии как до внесения стресс-условий, так и после окончания воздействия стрессирующих агентов. Полученные данные показывают, что при воздействии неблагоприятных факторов происходит резкий скачок АП на частоте 900 кГц и его снижение на 2100 кГц, что говорит об образовании кислородных радикалов, повреждении мембраны и попадании этих веществ в цитоплазму [Storz G. et al.,1990].

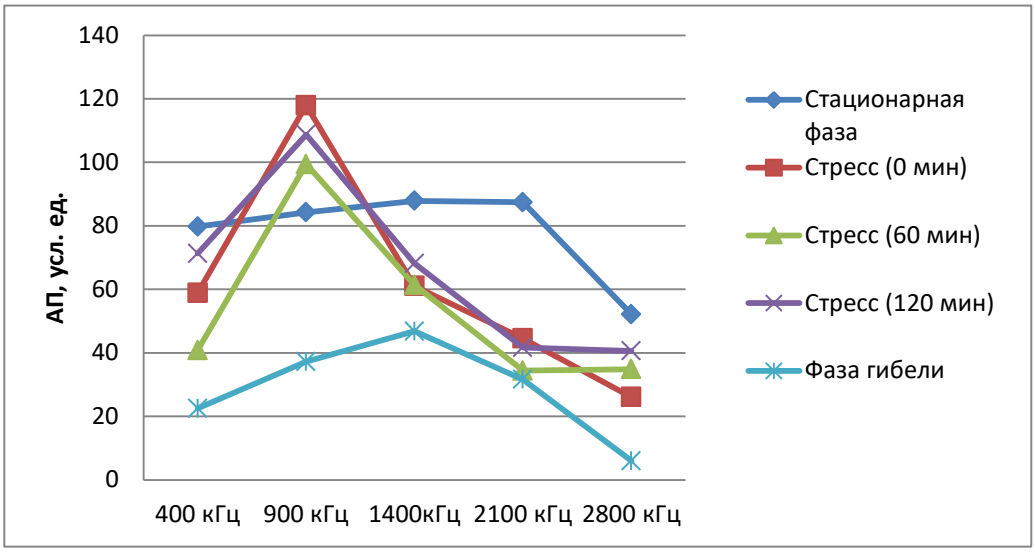


Рисунок 13 – Показатели АП *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в условиях температурного и оксидативного стресса

Другим, немаловажным фактором ответа бактерий на стресс-воздействие, является их размер. При накоплении токсичных веществ в клетке, клетка начинает забирать в себя воду, с целью коррекции нарушенного гомеостаза [Cesar S. et al., 2017]. При этом ее размер активно увеличивается. При нормализации внешних условий, бактериальная клетка выводит излишки воды, возвращаясь к нормальному размеру. В данном эксперименте у *F. tularensis* наблюдалась моментальная ответная реакция в виде сжатия клеток в ответ на воздействие, после чего клетки начинают постепенно увеличиваться, достигая максимума через 2 часа (+ 20 %) (Таблица 19).

Таблица 19 – Динамика физиологических показателей клеток вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в процессе культивирования

Этап	$АП_{900}$, усл. ед.	$АП_{2100}$, усл. ед.	Жизнеспособность, %	Размер, мкм
Стационарная фаза	84,26±3,8	87,43±5,7	100±4,0	1,671±0,32
Стресс (0 мин)	117,95±4,2	54,56±5,5	100±5,5	1,441±0,21
Стресс (60 мин)	99,43±3,3	31,65±3,2	74±3,1	1,761±0,21
Стресс (120 мин)	108,73±5,1	41,65±6,6	74±4,4	2,091±0,4
Фаза гибели (180 мин)	37,21±2,1	31,65±1,9	68±2,0	2,091±0,39

Окончательная гибель клеток наблюдалась через 3 часа после начала эксперимента – клетки не восстановили свой размер, а показатели АП снизились до минимальных значений.

При исследовании воздействия комплексного стресса на показатели жизнеспособности клеток туляремийного микроба разных подвидов были рассмотрены аналогичные параметры. Поскольку на модельном штамме было показано, что максимальные изменения АП происходили моментально и не изменялись в течение часа, для наблюдения за другими штаммами использовали показатели АП до воздействия и через 60 минут после (Таблица 20).

Таблица 20 – Динамика изменений АП при частоте ориентирующего поля 900 кГц и 2100 кГц, размеров клеток до (I) и после (II) оксидативного и температурного стресса

Штамм	Условия	$АП_{900}$, усл. ед.	$АП_{2100}$, усл. ед.	Размер, мкм	Жизнеспособность, %
F. tularensis subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^-)	I	80,46	93,13	1,773	100
	II	102,73 (+21,7 %)	34,85 (-62,6 %)	1,99 (+10,9 %)	74
F. tularensis subsp. *novicida* Utah 112	I	106,67	102,78	1,041	100
	II	134,23 (+25,84 %)	66,03 (-35,75 %)	1,084 (+3,97 %)	69
F. tularensis subsp. *holarctica* 503/840	I	136,26	122,75	1,043	100
	II	119,39 (-12,38 %)	78,69 (-35,9 %)	1,031 (-1,15 %)	81
F. tularensis subsp. *tularensis* B399 A-Cole	I	128,15	104,01	1,051	100
	II	102,92 (-19,68 %)	78,24 (-24,77 %)	1,031 (-1,9 %)	77

Установлено, что воздействие стрессового фактора вызывает снижение показателя АП на частоте 2100 кГц на 25-36% у всех исследованных штаммов, что свидетельствует о нарушении электропроводности цитоплазмы и метаболического статуса клеток. Параллельно наблюдается разнонаправленная динамика показате-

ля $АП_{900}$: увеличение у штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^-) и *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 и снижение у *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B399 A-Cole. Можно предположить, что данный феномен связан с вирулентностью микроорганизма. Наиболее вирулентными из представленных штаммов являются *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B399 A-Cole (DCL – 1 м.к.) [Мокриевич А.Н. и др., 2019]. Вероятно, эти штаммы обладают генетическими отличиями, которые влияют на компоненты клетки, повышая их устойчивость в организме хозяина.

Статистический анализ подтвердил наличие сильной корреляции ($r_s = 0,89$; $p < 0,05$) между изменениями электропроводности цитоплазмы и размера клетки. У вирулентных штаммов наблюдалось снижение уровня электрооптического сигнала, которое сопровождалось уменьшением размера клетки на 1,9 % и 1,1 % соответственно ($p < 0,05$). В противоположность этому, у авирулентных штаммов размер клеток увеличивался после стресс-воздействия, в среднем, на 4,1 % ($p < 0,05$). Полученные различия в стресс-ответе могут отражать различные стратегии адаптации вирулентных и низковирулентных штаммов к неблагоприятным условиям.

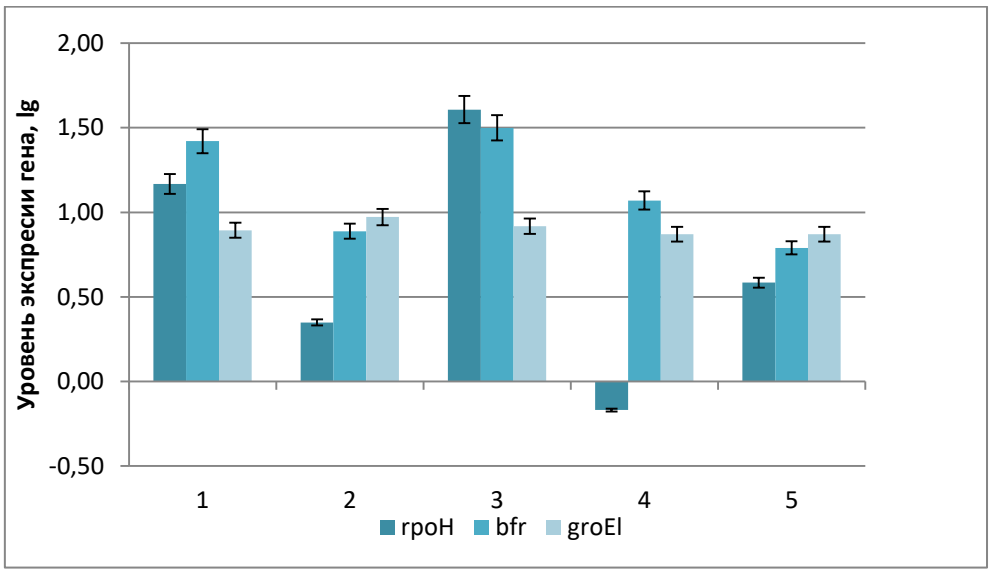
Так как частота 2100 кГц отражает состояние цитоплазматической мембраны, она более активно реагирует на внешние раздражители. И, хотя она не является единственной мишенью токсического воздействия пероксида водорода, активные формы кислорода взаимодействуют с мембранными липидами и могут вызывать изменения свойств мембраны, потенциально изменяя текучесть и фазовые характеристики, а также ее общую целостность [Van de Vossenberg J.LC.M. et al., 2000; Imlay J.A., 2003]. Такие изменения, в свою очередь, могут изменять эффективность первичных механизмов резистентности к стресс-условиям и других мембранозависимых функций, включая транспорт, проницаемость для ионов, рост и деление. Хотя цитоплазматическая мембрана является эффективным барьером против проницаемости O_2^-, гидроксид-радикалы (OH^-), образующиеся в процессе реакции Габера-Вейсса, взаимодействуют с

липидами мембраны, влияя на их заряд, гидратацию и конформацию, что, в свою очередь, может вызывать изменения в свойствах клеточных мембран [Mykytczuk N.C.S. et al., 2007]. Таким образом, цитоплазматическая мембрана сама по себе не является механизмом защиты от перекисного окисления, но может рассматриваться как первичный механизм акклиматизации, который позволяет бактериям оставаться жизнеспособными, опосредуя токсическое действие.

Для изучения роли температурного и перекисного стресса был проведен мониторинг экспрессии генов, принадлежащих к стрессовым регулонам (*groEl, rpoH, bfr*). Пробы для ПЦР-анализа отбирались спустя 60 минут после изменения условий на неблагоприятные.

На рисунке 14 показано, что большинство штаммов туляремийного микроба активно реагируют на стресс-воздействие активацией генов *groEl* и *bfr*. Наблюдаемая консервативность ответа подчеркивает универсальность адаптационных механизмов у *F. tularensis*, независимо от штаммовой принадлежности, что важно для понимания фундаментальных основ ее патогенности. Наиболее выраженный эффект наблюдался у авирулентных штаммов. Важно отметить, что у *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 экспрессия сигма-фактора была отрицательной относительно контроля. Данный факт может свидетельствовать о различиях в механизмах резистентности и регуляции *rpoH* в частности.

Экспериментальные данные выявили ряд важных закономерностей в регуляции генной экспрессии. Хотя литературные источники указывают на зависимость активности гена *groEl* от *rpoH*, в наших исследованиях коэффициент корреляции Спирмена между этими генами составил лишь 0,4, что свидетельствует о слабой взаимосвязи. В то же время была обнаружена сильная корреляционная зависимость (0,9) между генами *groEl* и *bfr*, что говорит о наличии тесной функциональной связи в экспрессии этих генов. Такие данные позволяют предположить альтернативные пути регуляции гена *groEl*, не описанные ранее в литературе.



1 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; 2 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap$^-$); 3 – *F. tularensis* subsp. *tularensis* B399 A-Cole; 4 – *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112; 5 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840. Уровень экспрессии представлен относительно нормальных условий. Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 14 – Экспрессия генов стресса у штаммов *F. tularensis* при окислительном и тепловом шоке

Для сравнительного анализа активности стресс-белков, вышедших в окружающую среду, использовался метод иммуноферментного анализа. Поскольку ранее было установлено, что IgHSP обладает более широким спектром узнавания (включая *F. tularensis* subsp. *novicida*), а также является наиболее чувствительным из всех полученных в данной работе иммуноглобулинов, он был применен для дальнейших экспериментов. В таблице 21 представлены средние показатели от трех экспериментальных повторов.

Таблица 21 – Определение специфической активности экскретируемых стресс-белков туляремийного микроба у штаммов *F. tularensis* разных подвидов до и после воздействия стресс-условий (реципрокный титр)

Условия	Штамм				
	F. tularensis 15 НИИЭГ	*F. tularensis* КМ-9 (Cap^-)	*F. tularensis* Utah 112	*F. tularensis* 503/840	*F. tularensis* B399 A-Cole
До стресса	42,6±14,2	170,6±56,8	32±0	37,3±17,7	26,6±7,1
После стресса	170,6±56,9	106,6±28,4	170,6±56,8	42,7±14,2	85,3±28,4

Установлено, что выход стресс-белков в окружающую среду при стресс-воздействии наблюдается активнее у штаммов, которые имеют сниженную вирулентность. Вероятно, это связано с тем, что вирулентные штаммы (*F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840, *F. tularensis* subsp. *tularensis* B399 A-Cole) оптимизировали метаболизм для скрытого внутриклеточного паразитизма, минимизируя «утечку» белков, которая могла бы демаскировать их перед иммунной системой. В это время *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 сохраняют способность к активному стресс-ответу, включая секрецию шаперонов. Атипичная реакция наблюдалась у авирулентного бескапсульного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* КМ-9 (Cap^-), продукция стресс-белков которого оставалась стабильно высокой. Это можно объяснить тем, что капсула является защитным слоем, предотвращая потерю внутриклеточных компонентов, а ее отсутствие приводит к нарушениям мембранной стабильности и секреторных механизмов.

У всех исследуемых штаммов, кроме *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, выявлена корреляция между экспрессией генов стресса и титрами секретируемых антигенов ($r_s > 0,8$). В случае подвида *novicida* зависимость между уровнем экспрессии генов и титром антигенов отсутствовала.

6.3 Изучение стресс-реакций *F. tularensis* в условиях *in vivo* при взаимодействии с клетками иммунной системы

В последнее время большое внимание научного сообщества привлекает изучение взаимодействия внутриклеточных патогенов с иммунными клетками хозяина. *F. tularensis*, обладая способностью проникать в макрофаги и лимфоциты, сталкивается с множественными стрессовыми факторами, включая воздействие активных форм кислорода, изменение pH и дефицит питательных веществ. Изучение адаптационных стратегий микроба имеет ключевое значение для понимания патогенеза туляремии, так как именно способность преодолевать внутриклеточный стресс определяет вирулентность микроорганизма. Особую важность представляет исследование влияния стрессовых условий на экспрессию бактериальных генов, связанных с метаболической перестройкой, репарацией ДНК и защитой от окислительного повреждения.

В данном разделе представлено исследование влияния внутренней среды иммунных клеток на экспрессию стресс-генов туляремийного микроба.

В лунки 96-луночного планшета с первичными макрофагами и лимфоцитами морских свинок добавляли по 100 мкл суспензии туляремийного микроба в концентрации 5×10^7 м.к. и инкубировали в течение 1, 6 и 24 часов. После проводили двукратную отмывку стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,0±0,2), а затем клетки обрабатывали 50 мкг/мл гентамицина в течение 1 ч при температуре 37 °C, после чего снова промывали стерильным ФСБ.

Для активации выхода *F. tularensis* из эукариотических клеток применяли добавление 100 мкл 0,1 % дезоксихолата натрия на лунку в течение 1 мин, после чего часть содержимого лунок отбирали для ПЦР, а часть высевали на чашки Петри с агаром FT для определения жизнеспособности.

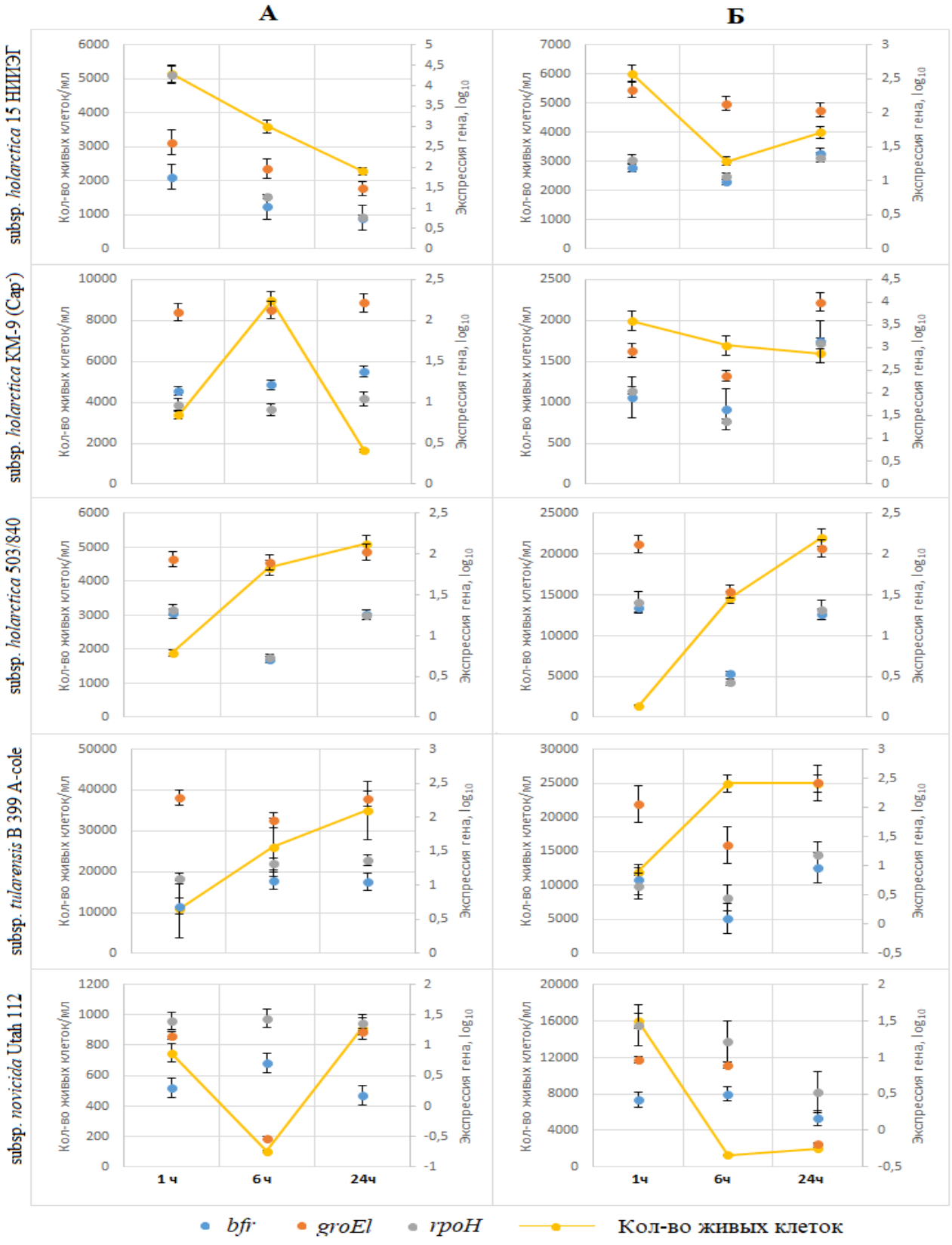
В связи с неполным фагоцитозом *F. tularensis* макрофагами и лимфоцитами, концентрация кДНК в образцах оказалась недостаточной для детекции всех проб методом ОТ-ПЦР, поэтому был применен более чувствительный метод цкПЦР.

Несмотря на недостаточную изученность механизмов инфицирования мак-

рофагов *F. tularensis*, согласно литературным данным [Bradford M.K. et al., 2020], средняя продолжительность цикла заражения иммунных клеток составляет около 2 часов. В данном эксперименте уровень экспрессии стресс-генов и жизнеспособность бактериальных клеток измеряли через 1, 6 и 24 часа после контакта с иммунными клетками.

Результаты исследования (Рисунок 15) выявили как общие закономерности, так и существенные различия между подвидами в экспрессии генов стресс-ответа (*bfr, groEl, rpoH*) при культивировании *F. tularensis* в макрофагах и лимфоцитах. Для всех исследуемых штаммов характерна стабильная экспрессия гена *groEl* на протяжении всего эксперимента, что подчеркивает его ключевую роль в поддержании гомеостаза клетки и защите от теплового и окислительного стресса независимо от фазы инфекционного процесса. В отличие от *groEl*, гены *rpoH* и *bfr* демонстрировали выраженное снижение активности к 6 часу культивирования, после чего наблюдался рост бактериальной популяции. Важно отметить, что такой эффект был характерен только для штаммов, обладающих высокой вирулентностью.

Обратная корреляция между снижением экспрессии *rpoH* и *bfr* и последующей активацией роста бактерий может отражать переход патогена от фазы стресс-адаптации к фазе активного размножения. Штаммы, сохранявшие стабильную экспрессию стресс-генов к 6 часу эксперимента, напротив, демонстрировали снижение численности клеток через 24 часа. Этот эффект может быть связан с неспособностью бактерий адаптировать свой метаболизм к изменяющимся внутриклеточным условиям или особенностями регуляции вирулентности у разных подвидов *F. tularensis*.



А – лимфоциты; Б – макрофаги. Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 15 – Сравнительный анализ экспрессии генов стресс-ответа у штаммов *F. tularensis* в лимфоцитах и макрофагах морских свинок

Полученные данные подчеркивают критическую важность временного контроля экспрессии генов стресс-ответа для успешной персистенции *F. tularensis* в организме хозяина. Динамика изменения экспрессии, по-видимому, является ключевым фактором, определяющим различия в вирулентности между штаммами. Эти результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов адаптации туляремийного микроба и могут быть использованы для разработки стратегий контроля бактериальной персистенции.

6.4 Комплексный подход в изучении антибиотик-индуцированного стресс-ответа у *F. tularensis*

В современных условиях глобального распространения антибиотикорезистентности бактерий особую актуальность приобретает изучение механизмов устойчивости микроорганизмов. Хотя клинические изоляты *F. tularensis* демонстрируют редкие случаи резистентности к стандартным антибиотикам [Müller S. et al., 2013; Tomaso H. et al., 2017], данный патоген обладает значительным эволюционным потенциалом для развития устойчивости. Как показывают исследования, это может происходить как в результате естественного отбора [Loveless B.M. et al., 2010], так и вследствие направленной генетической модификации *in vitro* [Chance T. et al., 2017].

Подбор антибиотиков, используемых в экспериментах, был осуществлен по механизму воздействия на бактериальные клетки, а также с учетом протоколов этиотропной терапии, используемых при лечении туляремии (Таблица 22) [Щипелева И.А. и др., 2020].

Таблица 22 – Антибактериальные препараты, примененные в эксперименте

Наименование	Класс	Воздействие на клетку
Пенициллин	β-лактамы	Препятствует синтезу пептидогликана, являющегося основным компонентом клеточной стенки бактерий, а именно подавляют транспептидазную реакцию синтеза компонентов клеточной стенки (например D-аланина).
Эритромицин	Макролиды	Обратимо связывается с 50S-субъединицей рибосом, что нарушает образование пептидных связей между молекулами аминокислот и блокирует синтез белков микроорганизмов (не влияет на синтез нуклеиновых кислот).
Налидиксовая кислота	Хинолоны	Подавляет репликацию ДНК путём ингибирования активности ДНК-гиразы.
Хлорамфеникол	Хлорамфениколы	связан с нарушением синтеза белков микроорганизмов за счёт блокирования пептидилтрансферазной активности путём связывания с 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы бактерий
Стрептомицин	Аминогликозиды	Оказывает бактерицидное действие за счёт связывания с 30S субъединицей бактериальной рибосомы, что в дальнейшем приводит к угнетению синтеза белка.
Цефалексин	Цефалоспорины I поколения	Действует бактерицидно, нарушая синтез клеточной стенки микроорганизмов.

На первом этапе проводили эксперимент по определению концентраций препаратов, приводящих к гибели 50 % бактериальных клеток – минимальная подавляющая концентрация ($МПК_{50}$) (Таблица 23).

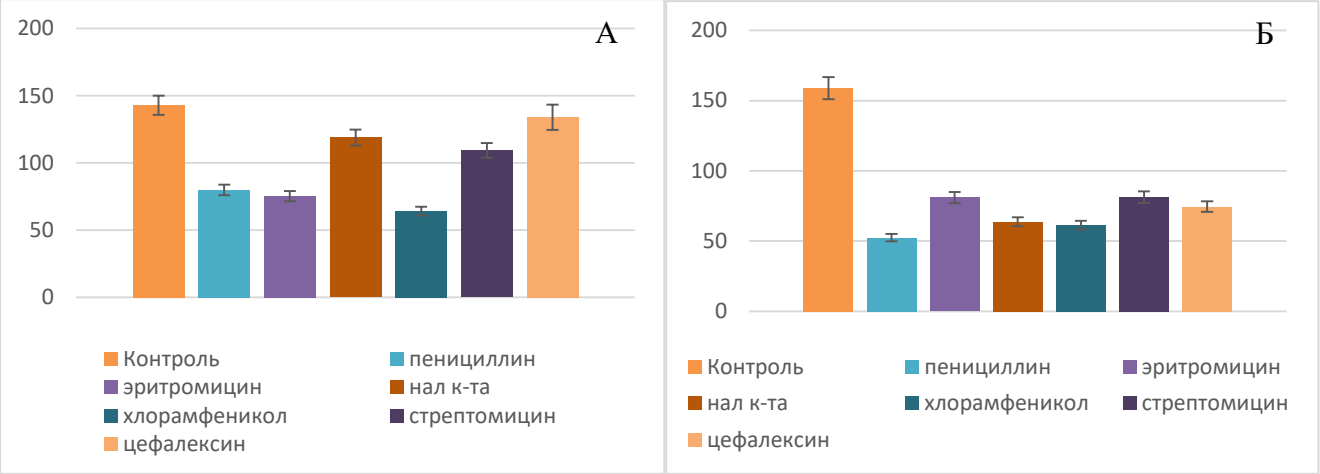
Таблица 23 – Концентрации антибиотиков, вызывающие гибель 50 % клеток вакцинного штамма туляремийного микроба.

Исследуемые препараты	$МПК_{50}$ (мг/л)
Пенициллин	2560
Эритромицин	640
Налидиксовая кислота	18
Хлорамфеникол	3,6
Стрептомицин	3,6
Цефалексин	1280

Работы проводились с использованием МТТ-теста [Mshana R.N. et al., 1998].

При статистическом анализе результатов МТТ-теста достоверность отличия образцов от контроля и друг от друга оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$). Действие антибиотиков было изучено в диапазоне концентраций 3 – 0,001 мг/мл.

Электрооптические показатели измеряли через 30 минут после добавления антибиотиков в питательную среду. При исследовании воздействия антибиотиков на *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ было показано, что немаловажную роль в ответе бактериальной клетки на препараты играет концентрация препарата в питательной среде (Рисунок 16).



Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости $\alpha=0,05$

Рисунок 16 – Влияние антибиотиков на анизотропию поляризуемости клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в ориентирующем поле с частотой 900 кГц (А) и 2100 кГц (Б)

Несмотря на то, что туляремийный микроб обладает устойчивостью к β-лактамным антибиотикам (пенициллину и цефалексину), при взаимодействии с ними ЭО показатели снижаются, причем пенициллин оказывает большее повреждающее действие на цитоплазму клетки. Это связано с высокой концентрацией антимикробных препаратов, так как они превышают минимальную ингибирующую концентрацию [Hotta A. et al., 2013]. Присутствие столь большого количества

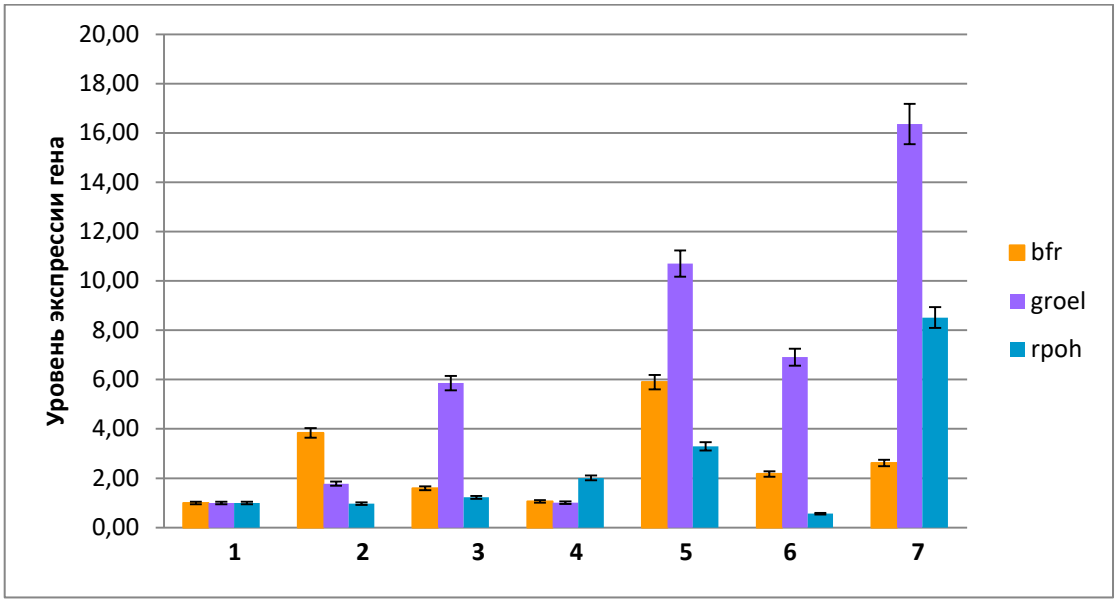
пенициллина привело к повышению проницаемости внешних структур клетки к антибиотику, разрушению пептидогликана клеток и непосредственного токсического эффекта на другие компоненты клетки, как это описывается для других микроорганизмов [Сидоренко С.В. и др., 2004].

Исходя из литературных данных, чувствительность к макролидам, в частности, к эритромицину, для туляремийного микроба неоднозначна. Так, изоляты, отобранные в очагах Сибири и Дальнего Востока, чувствительны к данному антибиотику, а штаммы, выделенные в Швейцарии, обладают устойчивостью к препарату [Олсуфьев И.Г., 1975; Baker C.N. et al., 1985]. В эксперименте наблюдалось снижение показателей АП для вакцинного штамма более чем на 50 %. При этом концентрация добавленного эритромицина была достаточно высокой.

Для лечения туляремии применяют антибиотики из группы аминогликозидов (стрептомицин), а также хлорамфеникол [Щипелева И.А. и др., 2020]. Показано, что для ингибирования роста *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ потребовались минимальные концентрации данных препаратов, что подверждает их высокую активность против данного микроорганизма.

В ходе исследования уровня экспрессии стресс-генов в ответ на неблагоприятные условия было определено, что независимо от степени чувствительности штамма туляремийного микроба, все антибиотики вызывали увеличение экспрессии генов. Показано, что ингибиторы трансляции (хлорамфеникол, стрептомицин, эритромицин) вызывают активную экспрессию *groEl*, но по-разному влияют на *rpoH*, что отражает вариабельность клеточного ответа на блокировку рибосом. Налидиксовая кислота (ингибитор ДНК-гиразы) слабо влияет на *bfr* и *groEl*, но стимулирует продукцию *rpoH*. Вероятно, в данном случае активируются альтернативные пути стрессового ответа (Рисунок 17).

Данные демонстрируют, что различные классы антибиотиков избирательно активируют гены стресса, что коррелирует с их молекулярными мишенями. Наибольший стрессовый ответ вызывают хлорамфеникол и стрептомицин, что подчеркивает их роль в активации стресс-ответа.



1 – контроль; 2 – пенициллин; 3 – эритромицин; 4 – налидиксовая кислота; 5 – хлорамфеникол; 6 – цефалексин; 7 – стрептомицин. Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 17 – Влияние антибактериальных препаратов на экспрессию генов *bfr, groEl, rpoH F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ

По результатам иммуноферментного анализа (Таблица 24) было определено, что выход белков теплового и окислительного стресса (HSP, GroEl/GroEs) в культуральную жидкость наиболее активен при воздействии налидиксовой кислоты (в 64 раза). Вероятно, это связано с механизмом действия препарата, целью которого является ДНК-гираза, не взаимодействующая со стресс-белками.

Необходимо отметить, что снижение синтеза всех исследуемых нами стресс-белков наблюдалось при воздействии хлорамфеникола и эритромицина несмотря на то, что штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ является эритромицинустойчивым. Вероятнее всего, это также связано с механизмом действия антибиотиков (нарушение синтеза белков).

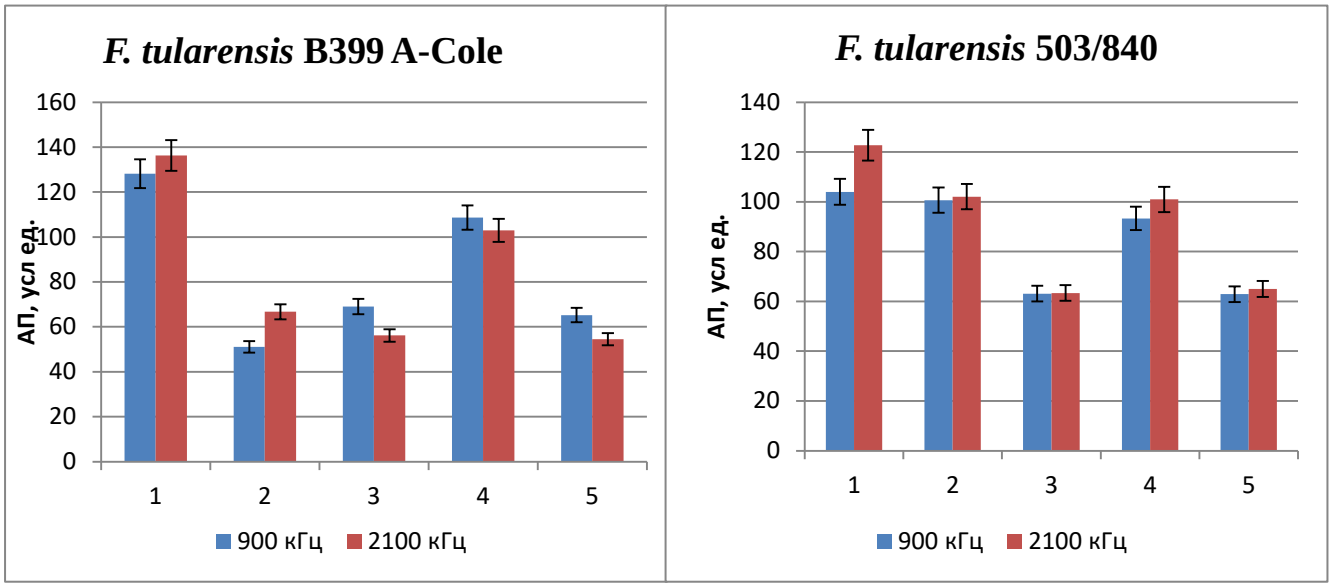
Таблица 24 – Результаты непрямого ИФА с Ig Bfr, Ig GroEl/GroEs и Ig HSP для оценки влияния антибиотиков на *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ

Наименование антибактериального препарата	Титр антигена в культуральной жидкости		
	Bfr	GroEl/GroEs	HSP
Контроль	1/32	1/32	1/32
Эритромицин	1/16	1/4	0
Стрептомицин	1/128	1/128	1/128
Налидиксовая к-та	1/256	1/256	1/256
Пенициллин	1/128	1/128	1/128
Цефалексин	1/64	1/128	1/8
Хлорамфеникол	1/16	1/16	1/16

Необходимо отметить, что снижение синтеза всех исследуемых нами стресс-белков наблюдалось при воздействии хлорамфеникола и эритромицина несмотря на то, что штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ является эритромицинустойчивым. Вероятнее всего, это также связано с механизмом действия антибиотиков (нарушение синтеза белков). Таким образом, применение ИФА в данном случае является нецелесообразным, поскольку подавление белкового синтеза под действием антибиотиков может приводить к значительным погрешностям при количественной оценке уровня стресс-белков.

Для оценки влияния антибактериальных препаратов на клетки вирулентных штаммов туляремийного микроба (*F. tularensis* subsp *holarctica* 503/840 *F. tularensis* subsp *tularensis* B399 A-Cole) использовали метод ЭО анализа и ОТ-ПЦР. Как известно, эти штаммы но имеют разную чувствительность к антибиотикам. Так, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 является устойчивым к эритромицину, а *F. tularensis* subsp *tularensis* B399 A-Cole – нет. Ранее в данной работе было показано, что эти штаммы имеют наиболее атипичный ответ при воздействии стресс-условий.

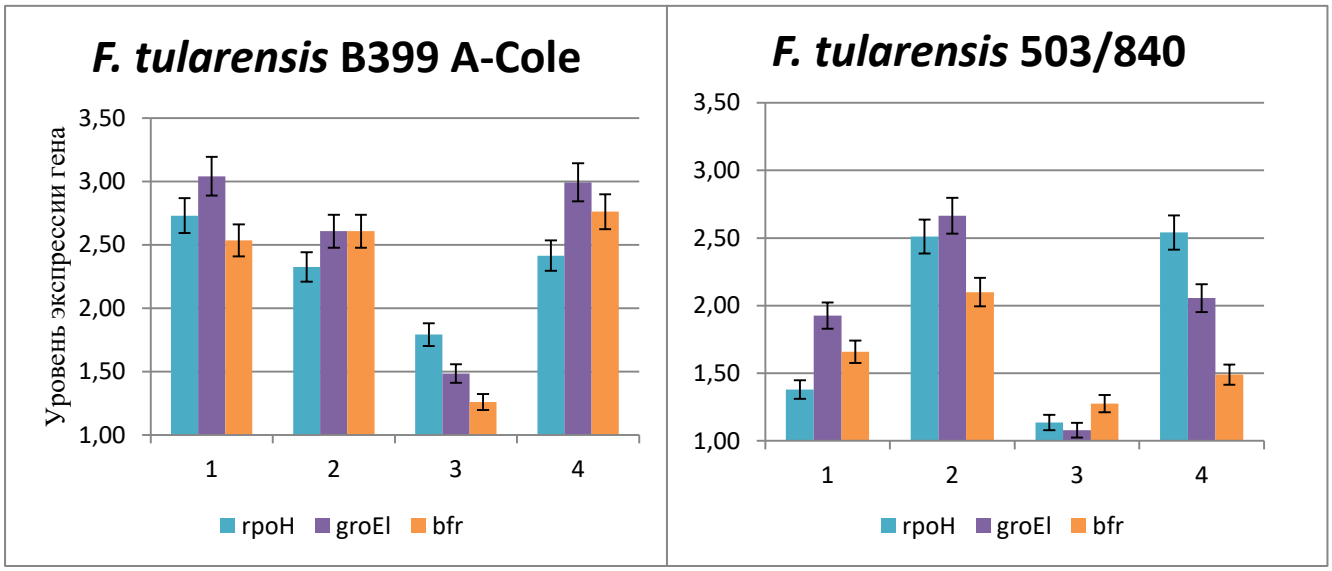
При ЭО анализе (Рисунок 18) было показано, что динамика изменения АП схожа с вакцинным штаммом. Отмечена зависимость между чувствительностью штамма к антибиотику и изменением его показателей жизнеспособности.



1 – контроль; 2 – эритромицин; 3 – стрептомицин; 4 – пенициллин; 5 – хлорамфеникол. Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 18 – Влияние антибактериальных препаратов на изменение АП клеток *F. tularensis* subsp *tularensis* B399 A-Cole и *F. tularensis* subsp *holarctica* 503/840 при частоте ориентирующего поля 900 кГц и 2100 кГц

Метод ОТ-ПЦР (Рисунок 19) показал качественное сходство профиля экспрессии генов у обоих исследуемых штаммов с *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в ответ на все примененные препараты. Но, в отличие от вакцинного штамма, у которого стрептомицин индуцировал 16-кратное увеличение экспрессии *groEl*, у вирулентных штаммов уровень экспрессии генов стресс-ответа не превышал 3-кратного значения. Исследования других микроорганизмов показывают, что аттенуированные штаммы часто демонстрируют гиперэкспрессию стресс-белков как компенсаторный механизм утраты вирулентности [Da Silva G.J. et al., 2017; Metaane S. et al. 2023]. Вирулентные изоляты, напротив, строго контролируют стресс-ответы для оптимальной выживаемости *in vivo*.



1 – эритромицин; 2 – стрептомицин; 3 – пенициллин; 4 – хлорамфеникол

Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости α=0,05

Рисунок 19 – Влияние антибактериальных препаратов на экспрессию генов *bfr, groEl, rpoH* у *F. tularensis* subsp *tularensis* B399 A-Cole и *F. tularensis* subsp *holarctica* 503/840

6.5 Оценка функционального состояния клеток вакцинного штамма туляремийного микроба в условиях длительного хранения

Вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ обладает высокой чувствительностью к условиям хранения, что отражается на стабильности его иммуногенных свойств при производстве и транспортировке живой туляремийной вакцины. Длительное пребывание микроорганизма в неблагоприятных условиях способно приводить к изменениям, влияющим на его биологическую активность и иммуногенные свойства. В связи с этим, изучение влияния длительного хранения на туляремийный микроб представляет собой важный этап для оптимизации существующих протоколов хранения.

В ходе эксперимента было проанализировано влияние длительного хранения в условиях лиофилизации, замораживания и пересевов на состояние вакцин-

ного штамма *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ. Двухсуточную культуру II генерации пересевали на скошенный FT-агар во флаконах с последующей 48-часовой инкубацией при температуре 37±1 °С. По завершении инкубации к каждому флакону добавляли 2,3±0,2 мл криопротекторной среды, состоящей из 10 % сахарозы, 1,5 % желатина и 0,1 % агара (pH 7,1±0,1) и ресуспендировали. Полученную суспензию с концентрацией (1,6±0,7) $\times 10^{11}$ КОЕ/мл разливали в ампулы для лиофилизации и пробирки для криоконсервации.

Лиофилизированные образцы хранили при температуре 4±1 °С, а замороженные – при минус 70±5 °С. Живую культуру поддерживали на чашках с FT-агаром, которую хранили при 4±1 °С с регулярными пересевами каждые 1-2 месяца.

Для определения жизнеспособности и воздействия условий хранения на электрические показатели клеток, культуру туляремийного микроба перед началом эксперимента ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации во всех образцах 5×10^8 м.к./мл. После чего производили измерения АП на частотах 900 и 2100 кГц. В качестве контроля жизнеспособности проводили стандартный высев ресуспендированной культуры на поверхность агаровой пластинки.

В таблице 25 отображены основные анализируемые показатели культуры вакцинного штамма туляремийного микроба в течение нескольких лет хранения. Было установлено, что длительное хранение вакцинного штамма туляремийного микроба в лиофилизированном и замороженном состоянии оказывает повреждающее действие на все структурные компоненты бактериальных клеток, увеличивающееся с каждым годом хранения. У культуры *F. tularensis,* хранение которой осуществлялось на плотной питательной среде с периодическими пересевами, снижение показателей жизнеспособности происходило гораздо медленнее.

Таблица 25 – Показатели физиологического состояния клеток *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения (1–3 года)

Условия	Параметр	Контроль	1 год	2 года	3 года
Лиофилизация (Л)	$АП_{900}$	158,6	108,4	106,74	43,14
	$АП_{2100}$	157,65	141,5	130,2	27,2
	Жизнеспособность (%)	100	70,0±14,5	69,3±8,3	48,7±14,5
Крио-консервация (К)	$АП_{900}$	158,6	124,8	117,9	42,15
	$АП_{2100}$	157,65	118,7	101,9	48,0
	Жизнеспособность (%)	100	88,0±4,1	87,0±7,2	73,0±1,9
Пересевы (П)	$АП_{900}$	158,6	154,3	152,04	146,6
	$АП_{2100}$	157,65	144,3	108,3	117,6
	Жизнеспособность (%)	100	99,7±3,18	97,7±1,2	97,0±1,4

В целом, полученные данные о жизнеспособности предполагают, что наиболее эффективным методом сохранения культуры являются пересевы. Криоконсервация показывает умеренную эффективность, а лиофилизация – наименьшую, со значительным снижением показателей АП и жизнеспособности.

Изучение динамики экспрессии генов стресс-белков проводили методом ОТ-ПЦР с количественным учетом результата. Было установлено, что в процессе длительного хранения *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ в лиофилизированном состоянии, экспрессия гена *rpoH* – транскрипционного фактора, активируемого при стрессе, увеличивается в 4 раза на 3 год хранения культуры (Рисунок 20). При этом наблюдается лишь незначительное повышение уровня экспрессии у созависимого стресс-гена *groEl*. Ген *bfr* практически не проявлял никаких изменений с течением времени, что связано с его иной функцией, направленной на регуляцию гомеостаза железа и не связанной с ответом на температурный стресс [Guo M. et al., 2022].

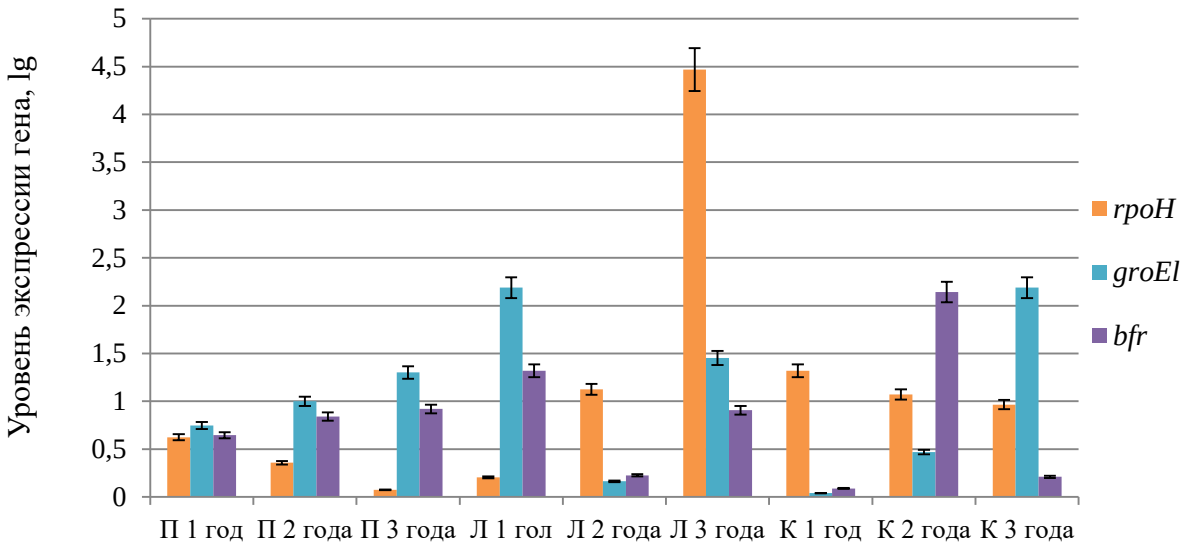


Рисунок 20 – Динамика экспрессии генов стресса при длительном хранении *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ в лиофилизированном состоянии (Л), криоконсервации (К) и пересевах (П)

Результаты полногеномного секвенирования штамма *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ, подтвердили его высокую генетическую стабильность в процессе всего срока хранения во всех изучаемых условиях. В ходе исследования была обнаружена консервативная мутация C178404T и делеции в генах *pilAE* и *lpp*, которые возникали и стабильно поддерживались в культуре независимо от способа её хранения: лиофилизация, низкотемпературное замораживание или пассажи на твёрдых питательных средах. При изучении целевых генов *rpoH, bfr, groEl* в исследуемых субкультурах делеций или мутаций обнаружено не было.

Хранение вакцинного штамма туляремийного микроба на твёрдых питательных средах с периодическими пересевами вызвали единичные мутации с заменой аминокислоты в генах, кодирующих DNA polymerase III (важнейшего ферментного комплекса, участвующего в репликации прокариотической ДНК), YdiU family protein (моделирующего передачу сигналов бактериального стресса, эффективно защищающего клетки от вызванного стрессом истощения АТФ), DEAD/DEAH box helicase, phosphatidate cytidylyltransferase (способствуют передаче сигналов врожденного иммунитета, служат сенсорами для нуклеиновых кислот,

что приводит к индукции интерферона и интерферон-стимулируемых генов). При этом замены нуклеотидов A208679C, G841623T, C1196981T отмечены в самом начале хранения на твердых питательных средах, тогда как G228618T – только после трех лет хранения при аналогичных условиях (Таблица 26).

Таблица 26 – Единичные мутации в геноме штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившегося на твердых питательных средах с периодическими пересевами.

Позиция и тип нуклеотида по последовательности *F. tularensis* 15 НИИЭГ (NCBI GenBank № CP066295)		Тип нуклеотида в геноме штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившегося на твердых питательных средах (эксперимент) в течение		Тип мутации	Наименование гена и кодируемого белка (*F. tularensis* 15 НИИЭГ (NCBI GenBank № CP066295))
		1 год	3 года		
208679	A (A**A**G) lysine	C (A**C**G) threonine	C (A**C**G) threonine	Несинонимичная замена	*A4S07_000001040* – ДНК полимераза III (DNA polymerase III)
841623	G (**G**CA) alanine	T (**T**CA) serine	T (**T**CA) serine	Несинонимичная замена	*A4S07_000004325* – белок семейства YdiU (YdiU family protein)
1196980/ 1196981	TC (**TC**C) serine	AT (**AT**C) Isoleucine	AT (**AT**C) Isoleucine	Несинонимичная замена	*A4S07_000006215* – хеликаза бокса DEAD/DEAH (DEAD/DEAH box helicase)
228618	G (AT**G**) methionine	G (AT**G**) methionine	T (AT**T**) isoleucine	Несинонимичная замена	*uppS* – декапренилцистрансфераза (decaprenylcistransferase)

Поскольку длительное хранение приводит к накоплению стресс-белков в клетках, важно было изучить влияние разных условий на продукцию исследуемых белков методом иммуноферментного анализа с использованием специфических иммуноглобулинов к антигенам (Таблица 27).

Таблица 27 – Влияние условий длительного хранения на продукцию стресс-белков штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Иммуноглобулин	Время хранения, лет	Условия хранения		
		Лиофилизация	Криоконсервация	Пересевы
Ig Bfr	1	$9,2±2,2×10^6$	$1,1±1,0×10^7$	$5±1,5×10^6$
	2	$7,2±1,8×10^6$	$8,6±2,7×10^6$	$2,1±0,5×10^6$
	3	$3,6±3,4×10^6$	$9,0±3,3×10^6$	$1,3±0,4×10^6$
Ig GroEl/GroEs	1	$9,8±1,5×10^6$	$1,7±0,6×10^7$	$4,0±1,2×10^6$
	2	$5,5±2,6×10^6$	$1,6±2,5×10^7$	$5,5±1,6×10^6$
	3	$1,8±1,9×10^6$	$8,6±3,3×10^6$	$1,5±3,4×10^6$
Ig HSP	1	$4,0±1,0×10^6$	$5,4±1,1×10^6$	$1,9±0,5×10^5$
	2	$3,4±1,4×10^6$	$1,2±4,1×10^6$	$2,4±0,8×10^5$
	3	$2,0±1,8×10^6$	$7,7±1,2×10^6$	$5,3±3,4×10^5$

Результаты непрямого ИФА подтверждают данные, полученные методом ПЦР, и демонстрируют, что длительное хранение *F. tularensis* приводит к активации стрессового ответа, что выражается в нарастании титра специфических антигенов, особенно при регулярных пересевах. Можно заметить, что уровень антител к белку GroEl/GroEs повышается умеренно, что говорит о частичной активации шаперонной системы. При этом количество белка Bfr практически не изменяется, что подтверждает его слабую зависимость от стрессового ответа и связь с регуляцией гомеостаза железа. При определении уровня продукции стресс-белков Ig HSP было показано, что в условиях периодических пересевов клетки накапливают большее количество стресс-белков. Вероятно, пересевы создают кумулятивный стресс, приводящий к устойчивой активации шаперонных систем, что согласуется с данными ПЦР.

Остаточная вирулентность у культуры вакцинного штамма, хранившегося в лиофилизированном и замороженном состоянии, не имела достоверных отличий и соответствовала установленным требованиям, предъявляемым к вакцинному штамму. Увеличение показателя LD_{50} штамма, хранившегося на твердых питательных средах, подтверждает, что хранение подобным образом приводит к снижению его остаточной вирулентности (Таблица 28).

Таблица 28 – Показатели LD_{50} для белых мышей (м.к.) вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившегося в разных условиях в течение трёх лет

Время хранения, год	Условия хранения		
	Лиофилизация	Криоконсервация	Пересевы
1	2403	5481	438000
2	3474	6605	2779672
3	4990	25617	4945000

Таким образом, полученные данные показывают, что длительное хранение, независимо от способа, неблагоприятно действует на клетки туляремийного микроба.

Хранение штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на твердых питательных средах с периодическими пересевами, оказывает меньшее отрицательное действие на клетку. Однако, остаточная вирулентность такого штамма, снижается достаточно быстро, и уже через год этот показатель возрастает в 200 раз, а после трёх лет остаточная вирулентность перестаёт соответствовать регламентированным требованиям – $4{,}9\times10^6$ м.к. (норма 1×10^2–2×10^6 м.к.). Лиофилизация и криоконсервация, хоть и вызывают повреждение клеток, но оставляют штамм стабильным. Таким образом, пересевы имеют место быть только в коротких лабораторных экспериментах, а два других метода подходят для длительного хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характерной особенностью возбудителя туляремии *F. tularensis* является выраженная экологическая пластичность, проявляющаяся в способности успешно колонизировать различные экологические ниши – от организмов теплокровных животных до водных сред [Rouco C. et al., 2023]. Эта уникальная способность к смене местообитаний неизбежно подвергает бактерию воздействию разнообразных стрессовых факторов окружающей среды, что требует от микроорганизма сложных адаптационных механизмов. В этом контексте ключевое значение приобретают комплексные исследования, направленные, во-первых, на изучение воздействия основных стрессовых факторов на бактериальные клетки, и во-вторых, на анализ молекулярных механизмов адаптационного ответа микроорганизма на неблагоприятные условия среды.

Молекулярно-генетические методы, в частности количественная ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР), позволяют выявлять гены стресса и анализировать динамику их экспрессии в ответ на действие неблагоприятных факторов. Параллельное применение электрооптического анализа дает возможность оценивать функциональное состояние бактериальных клеток *in situ*, отслеживая в режиме реального времени их физиологические изменения при воздействии стрессоров. Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг используются для детекции выхода экскретируемых стресс-белков в культуральную жидкость и оценки их иммуногенной активности.

Особый научный интерес представляет изучение секретируемых антигенов, образующихся у *F. tularensis* в условиях стрессового воздействия. Эти соединения, обладающие выраженной иммунологической активностью и протективными свойствами [Родионова И.В. и др., 1990], имеют значительный практический потенциал. Однако, несмотря на их очевидную важность, физико-химические свойства данных антигенов, условия их образования и регуляция синтеза остаются недостаточно изученными.

Перспективность исследований в данном направлении обусловлена двумя

основными аспектами. С фундаментальной точки зрения, они позволяют глубже понять механизмы стресс-адаптации высокопатогенного микроорганизма. В прикладном аспекте полученные знания могут быть использованы для разработки новых эффективных профилактических препаратов и усовершенствования существующих диагностических систем, что особенно важно для регионов с природными очагами туляремии.

Настоящая диссертационная работа представляет собой комплексное исследование функционального состояния *F. tularensis* при различных стрессовых воздействиях. В ходе работы разработан и апробирован инновационный методический подход, объединяющий молекулярно-генетические, биофизические и иммунохимические методы, что позволило получить новые данные о стресс-ответе возбудителя туляремии. Также проведена работа по получению секретируемых стресс-белков, изучению их антигенных, физико-химических и иммунобиологических свойств.

Ключевым достижением исследования стала разработка высокочувствительных и специфичных методов детекции экспрессии генов *groEl, bfr* и *rpoH* с использованием ОТ-ПЦР и цкПЦР, что открывает возможности для мониторинга физиологического состояния бактерий в различных условиях. А применение электрооптического анализа продемонстрировало свою эффективность для оценки жизнеспособности клеток в режиме реального времени, что особенно ценно для контроля качества вакцинных штаммов и оптимизации условий культивирования.

При моделировании условий, имитирующих стресс-факторы макроорганизма, наибольшую устойчивость продемонстрировали штаммы *F. tularensis* subsp *holarctica* 503/840 и *F. tularensis* subsp *tularensis* B399A-Cole. Это проявлялось в особенностях экспрессии генов g*roEl, bfr* и *rpoH*, а также в сниженной продукции соответствующих антигенов по сравнению с другими исследуемыми штаммами. Удивительно, но схожие результаты наблюдались и у авирулентного бескапсульного штамма *F. tularensis* subsp *holarctica* КМ-9 (Cap^-). Таким образом, можно предположить, что отсутствие капсулы приводит к изменениям в ответе на стресс-

воздействия.

Взаимодействие клеток туляремийного микроба с клетками иммунной системы приводило к резкому спаду экспрессии генов стресса через 6 часов инкубации. Важно отметить, что штаммы, у которых происходило снижение экспрессии генов стресса, спустя 24 часа после начала эксперимента восстанавливали свою активность и были более жизнеспособными.

Установлено, что условия, имитирующие стрессовое воздействие на клетки туляремийного микроба в организме млекопитающего, вызывают повышение экспрессии генов стресса, приводящие к каскаду реакций, в том числе, к продукции стресс-белков. При этом наблюдались отличия в реакции на стресс у штаммов разных подвидов. Исследование адаптационных механизмов *F. tularensis* в условиях, имитирующих внутриклеточную среду макрофагов, внесло важный вклад в понимание патогенеза инфекции. Установлено, что вирулентные штаммы демонстрируют меньший выход стресс-белков в культуральную жидкость, что может быть связано с их стратегией скрытого паразитирования.

Применение комплексного подхода, объединяющего электрооптический анализ, молекулярно-генетические и иммунохимические методы, дало возможность получить всестороннюю характеристику стресс-ответа *F. tularensis*. Метод электрооптического анализа позволил зафиксировать динамику клеточных изменений при комбинированном стресс-воздействии (42 °C + 5 мМ H_2O_2) *in vitro*, подтвердив его эффективность для индукции синтеза ключевых стресс-белков (Bfr, GroEl/GroEs, HSP). В экспериментах *in vivo* было установлено, что временная регуляция экспрессии генов (*bfr, groEl, rpoH*) играет критическую роль в способности патогена к внутриклеточной персистенции, что подтверждено методами ПЦР при работе с макрофагами. Изучение стресс-воздействия на бактериальные клетки выявило четкую корреляцию между активацией специфических генов и изменением электрооптических показателей, а применение ИФА позволило зафиксировать избирательную секрецию белков. Полученные результаты углубили понимание адаптационных механизмов *F. tularensis*, а примененный комплексный подход

доказал свою высокую эффективность как для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных задач в изучении туляремийного микроба.

Следующий этап исследований направлен на оптимизацию способа получения антигенов из культуральной жидкости после управляемого культивирования вакцинного штамма туляремийного микроба. Получено три антигенных препаратов: белок Bfr с молекулярной массой 17 кДа, двойной белок GroEl/GroEs – 57/10 кДа и многокомпонентный антиген HSP, содержащий пять основных белковых фракций с молекулярными массами в диапазоне от 10 до 90 кДа. Все антигены взаимодействовали со специфическими антителами в ИФА в минимальной концентрации 1 мкг/мл для Bfr и 2 мкг/мл для GroEl/GroEs и HSP. Оба антигенных комплекса оказались термостабильными, не теряли своей активности при повышении температуры до 85 ^{o}C. Bfr оказался менее устойчивым к повышенным температурам и был менее активен в ИФА после прогревания.

Экспериментально установлено, что все полученные антигены нетоксичны, индуцируют выраженный антительный ответ у лабораторных животных и не оказывают цитотоксического действия на спленоциты. Исследование протективной активности показало, что все изучаемые препараты обеспечивают защиту животных от гибели при экспериментальной туляремийной инфекции, вызванной вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840.

Разработаны две схемы иммунизации кроликов, позволившие получить серии гипериммунных сывороток против каждого целевого антигена. Установлено, что все полученные сыворотки обладают специфичностью к иммунодоминантным субъединицам и демонстрируют кросс-реактивность с различными подвидами туляремийного микроба. Разработанные схемы иммунизации с применением адъювантов позволили получить высокоактивные поликлональные антитела, которые могут применяться в лабораторной диагностике туляремии.

Полученные из гипериммунной сыворотки поликлональные антитела Ig Bfr, Ig HSP и Ig GroEl/GroEs в непрямом ИФА выявляли клетки *F. tularensis* голарктического, неарктического и среднеазиатского подвидов в концентрации, в среднем,

$(1\pm3,7)\times10^7$ м.к./мл для Ig Bfr и Ig HSP. Для Ig GroEl/GroEs этот показатель составлял $(2,5\pm0,7)\times10^7$. Подвид *novicida* детектировался в концентрации до $(1\pm0,6)\times10^8$ м.к./мл, что, согласно литературным данным, может объясняться особенностями структурной организации и антигенной специфичности, отличающими его от других подвидов туляремийного микроба. [Kingry L.C. et. al., 2014]. Для гетерологичных штаммов отмечена 100 % специфичность в концентрации 10^9 м.к./мл.

Применение исследуемых белков в качестве сенситина в ИФА позволило детектировать специфические антитела против *F. tularensis* в сыворотках инфицированных, иммунизированных и вакцинированных животных. Наибольшие титры антител (до 1:640) зарегистрированы при использовании белкового комплекса HSP и GroEl/GroEs. Примечательно, что белок Bfr, несмотря на свою выраженную протективную активность, демонстрировал минимальную способность к выявлению специфических антител (максимальный титр 1:20). Экспериментальные антигенные диагностикумы показали 100 % специфичность как в тестах с нормальными сыворотками, так и при анализе коммерческих гетерологичных антительных препаратов.

Практическая значимость работы подтверждается разработкой методических рекомендаций, способа выделения стресс-белков и баз данных. Результаты исследования могут быть использованы для совершенствования технологий производства иммунобиологических препаратов, а также для разработки новых подходов к терапии туляремии, направленных на подавление бактериальной устойчивости к стрессу.

Проведённое исследование закладывает методологическую основу для изучения регуляции стресс-респонсивных генов у *F. tularensis*, разработки субъединичных вакцинных препаратов и совершенствования контроля качества штаммов-продуцентов. Полученные результаты существенно расширяют современные представления о молекулярных механизмах адаптации туляремийного микроба к стрессовым условиям и открывают новые перспективы для разработки эффектив-

ных противоэпидемических мер. Практическая значимость работы может быть реализована в различных областях, включая биотехнологическое производство, разработку профилактических и диагностических препаратов. Полученные данные создают фундамент для дальнейших исследований, направленных на детализацию сигнальных путей адаптации патогена и оптимизацию методов генетического мониторинга штаммов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ определения уровня экспрессии генов стресс-белков (*groEl, bfr, rpoH*) молекулярно-генетическими методами (ОТ-ПЦР и цкПЦР), позволяющий количественно оценивать экспрессию генов у разных подвидов *F. tularensis* в ответ на стрессовые воздействия. Подобраны специфичные праймеры и зонды к участкам генов-регуляторов стресс-ответа (*bfr, groEl, rpoH*), доказана их чувствительность, позволяющая выявлять кДНК туляремийного микроба (до 10^4 м.к./мл для ОТ-ПЦР и 10^1 м.к./мл для цкПЦР), и специфичность (отсутствие взаимодействия с гетерологичными микроорганизмами).

2. Полученные экспериментальные данные подтверждают возможность использования электрооптического анализа для оценки жизнеспособности клеток *F. tularensis* при стрессовом воздействии и демонстрируют наличие сильной статистически значимой корреляции ($r_S \approx 0{,}9$; $p < 0{,}05$) показателя анизотропии поляризуемости (АП) с долей жизнеспособных клеток, что определяет потенциал метода для контроля состояния бактериальной культуры в режиме реального времени.

3. Установлено, что стресс-белки *F. tularensis* (HSP, GroEl/GroEs, Bfr) не проявляют токсичности *in vivo* и индуцируют пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Доказана эффективность однократной иммунизации данными антигенами мышей линии BALB/c против подкожного заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840: значения индекса иммунитета для HSP, GroEl/GroEs и Bfr составили 232, 158 и 72,5, соответственно.

4. Применение стресс-белков *(*GroEl/GroEs, HSP*)* в ИФА (в качестве сенситинов) и в иммуноблоттинге (в качестве маркерных антигенов) позволило детектировать специфические антитела в сыворотках крови вакцинированных и переболевших животных. Наибольшей иммунореактивностью в серологических тестах характеризовался комплекс GroEl/GroEs.

5. Разработана схема иммунизации кроликов-продуцентов с использованием исследуемых антигенов в комплексе с адъювантами (коллоидное золото и хитоза-

новые частицы), позволившая получить специфические антисыворотки с минимальным уровнем гетерологичных антител. На основе этих поликлональных антител созданы экспериментальные иммуноферментные диагностические системы (ИФА и иммуноблоттинг), демонстрирующие чувствительность в детекции всех подвидов возбудителя туляремии (до $3{,}12\times10^6$ м.к./мл) и не проявляющие перекрестной реактивности с гетерологичными бактериями.

6. Показано, что температурный стресс, перекисное окисление, антибиотики и взаимодействие с иммунными клетками хозяина активировали гены *groEl* и *bfr*, при этом экспрессия *rpoH* варьировала в зависимости от штамма туляремийного микроба. У вирулентных штаммов наблюдалось снижение показателя анизотропии поляризуемости на частоте 900 кГц и меньший выход стресс-белков в культуральную жидкость, в среднем, в два раза. Разработанный комплексный методический подход, включающий биофизический, иммунохимический и молекулярно-генетический методы анализа, позволил охарактеризовать стресс-ответ *F. tularensis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АП	анизотропия поляризуемости
АСМ	атомно-силовая микроскопия
БСА	бычий сывороточный альбумин
ГКПБ	Государственная коллекция патогенных бактерий
ГНЦ ПМБ	Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ДИА	дот-иммуноанализ
дНТФ	дезоксинуклеотидтрифосфат
ЖТВ	живая туляремийная вакцина
ИФА	иммуноферментный анализ
кДа	килодальтон
кДНК	комплементарная ДНК
КОЕ	колониеобразующая единица
КПК	капсулоподобный комплекс
КТС	коммерческая лошадиная туляремийная сыворотка (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Россия).
ЛПС	липополисахарид
МЕ	международные единицы
м.к.	микробная клетка
МУ	методические указания
НИИЭГ	научно-исследовательский институт вакцин эпидемиологии и гигиены
ОСО	отраслевой стандартный образец
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПБА	патогенные биологические агенты
ПЦР	полимеразная цепная реакция

ФСБ	фосфатно-солевой буфер
хч	химически чистый
цкПЦР	цифровая капельная ПЦР
чда	чистый для анализа
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ABTS	2,2'-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота)
Bfr	бактериоферритин
Ct	пороговое число циклов ПЦР (cycle threshold)
DCL	безусловно смертельная доза (dosis certe letalis)
ED_{50}	средняя иммунизирующая доза (Effective dose 50%)
FPI	остров патогенности туляремийного микроба (pathogenicity island of *F. tularensis*)
HSP	белки теплового шока (heat stress proteins)
Ig	иммуноглобулины
LD_{50}	средняя летальная доза (Dosis letalis 50%)
OMP	белки наружной мембраны (outer membrane proteins)
OMV	везикулы внешней мембраны (outer membrane vesicles)
SDS	додецилсульфат натрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баснакьян, И.А. Стресс у бактерий / И.А. Баснакьян. – Москва: Медицина, 2003. – 136 с.

2. Бибиков, Д.Н. Разработка новых методических приемов культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов оценки качества вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: дис. канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Бибиков Дмитрий Николаевич. – Саратов, 2021. – 162с.

3. Болотский, М.Н. Изучение воздействия на популяцию бактерий рода *Listerya* низких температур (сканирующая электронная микроскопия) / М.Н. Болотский // Актуальные проблемы современной науки. – 2007. – Т. 38, №6. – С. 144–146.

4. Волошин, А.Г. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий / А.Г. Волошин, В.Д. Бунин, В.В. Веревкин, С.Г. Игнатов // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 4. – С. 46–49. – DOI 10.20953/2500-1027-2017-4-46-49.

5. Гаевская, Н.Е. Анализ эпидемиологической ситуации по туляремии в 2024 г. и прогноз на 2025 г. на территории Российской Федерации / Н.Е. Гаевская, Н.Л. Пичурина, Д.В. Транквилевский [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2025. № 3. С. 28-36. – DOI 10.21055/0370-1069-2025-3-28-36.

6. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Москва: Практика, 1998. – 460 с.

7. Горбатов, А.А. Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEl FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител / А.А. Горбатов, Е.А. Панферцев, Е.В. Баранова [и др.] // Бактериология. – 2017. – Т. 2, № 3. – С. 9–15. – DOI 10.20953/2500-1027-2017-3-9-15.

8. Горохов, В.В. Температурная зависимость длительности флуоресценции триптофана как показатель динамики его микроокружения / В.В. Горохов, Б.Н. Корватовский, П.П. Нокс [и др.] // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 498, № 1. – С. 233–240. – DOI 10.31857/S2686738921030057.

9. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII. – Москва, 2015. – 704 с.

10. Гулий, О.И. Электрооптический анализ микробных суспензий для определения метаболической активности клеток и их детекции: дис. докт. биол. наук: 03.00.07 / Гулий Ольга Ивановна. – Саратов, 2006. – 317с.

11. Гулий, О.И. Определение фагоустойчивости микробных клеток *E. coli* с помощью метода электрооптического анализа клеточных суспензий / О.И. Гулий, Л.Н. Маркина, В.В. Игнатов // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2010. – №3. – С 37–39.

12. Гулий, О.И. Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки / О.И. Гулий, В.Д. Бунин, О.В. Игнатов // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т 61, № 3–4. – С. 3–13.

13. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петербург, – 2010. – 48 с.

14. Дыкман, Л.А. Адъювантные свойства наночастиц золота / Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, В.А. Богатырев, С.Ю. Щеголев // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 11-12. – С. 58-68.

15. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – Москва: Высшая школа, 1991. – 288 с.

16. Еремеев, А.В. Методы оценки жизнеспособности клеток, культивируемых *in vitro* в 2D- и 3D-структурах / А.В. Еремеев, А.С. Пикина, Т.В. Владимирова, А.Н. Богомазова // Гены и клетки. – 2023. – Т. 18, № 1. – С. 5–21. – DOI 10.23868/gc312198.

17. Ерохин, П.С. Динамическая характеристика микроорганизмов в условиях неблагоприятного действия факторов абиотической природы методом сканирующей зондовой микроскопии / П.С. Ерохин, Н.П. Коннов, С.П. Заднова, Т.В. Бугоркова // Вестник Саратовского государственного технического университета. –

2015. – Т. 81, №1. – С. 23–28.

18. Иванов, А.Ю. Исследование изменений электроориентации клеток *E. coli* при действии дезинфектантов / А.Ю. Иванов // Микробиология. – 1985. – Т. 54, № 5. – С. 826–829.

19. Игнатов, С.Г. Электрооптический анализ в микробиологии / С.Г. Игнатов. – Серпухов: ФГУН ГНЦ ПМБ, 2007. – 159 с.

20. Кантор, Ч.Р. Биофизическая химия / Ч. Кантор, П. Шиммел. – Москва: Мир, 1984. – 493 с.

21. Карцева, А.С. Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ / А.С. Карцева, О.В. Калмантаева, М. В. Силкина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 3. – С. 62–69. – DOI 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69.

22. Кузнецова, Е.М. Структурно-функциональная характеристика основных антигенов *Francisella tularensis* / Е.М. Кузнецова, И.А. Шепелёв, О.А. Волох // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 2. С. 44–49.

23. Кузнецова, Е.М. Комплекс Bfr-О-антиген внешних мембран *Francisella tularensis*: получение, характеристика, возможности использования / Е.М. Кузнецова, О.А. Волох, Я.М. Краснов [и др.] // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 1. – С. 73–81. – DOI 10.21519/0234-2758-2019-35-1-73-81.

24. Курашова, С.С. Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин / С.С. Курашова, Т.К. Дзагурова, А.А. Ишмухаметов [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 2. – С. 81–91. – DOI 10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91.

25. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.

26. Лапин, А.А. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* / А.А. Лапин, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Т. 102, № 4. –

С. 66–67.

27. Эпидемиологический надзор за туляремией: методические указания МУ 3.1.2007-05. – Москва, 2007.

28. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569-09. – Москва, 2009.

29. Мокриевич, А.Н. Биологические свойства и строение липополисахарида вакцинного штамма *Francisella tularensis*, полученного при инактивации гена системы «чувства кворума» *qseC* / А.Н. Мокриевич, А.Н. Кондакова, Э. Валаде [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 4. – С. 539–548.

30. Павлов, В.М. Характеристика штаммов туляремийного микроба, выделенных от больных людей и мелких грызунов во время эпидемии туляремии в Ханты-Мансийске в 2013 г / В.М. Павлов, И.И. Козлова, А.Н. Мокриевич [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 2. – С. 58-62.

31. Олсуфьев, Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии: научное издание / Н.Г. Олсуфьев. – Москва: Медицина, 1975. – 192 с.

32. Олсуфьев, Н.Г. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis* / Н.Г. Олсуфьев, И.С. Мещерякова // Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунол. – 1982. – № 26. – С. 291–299.

33. Оноприенко, Н.Н. Сравнительная характеристика липополисахаридов бактерий рода *Francisella*: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.07 / Оноприенко Наталья Николаевна. – Ростов-на-Дону, 2001. – 23 с.

34. Осина, Н.А. Внутривидовая дифференциация *Francisella tularensis* с помощью полимеразной цепной реакции / Н.А. Осина, С.А. Портенко, Л.Н. Ивашенцева, А.Н. Куличенко // Генодиагност. инфекцион. болезн.: материалы Росс. науч.-практ. конф. (25–27 октября 2005 г., г. Новосибирск). – Новосибирск, 2005. – С. 138 – 140.

35. Павлович, Н.В. Прозрачная питательная среда для культивирования

Francisella tularensis / Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 2. – С. 133–137.

36. Патент № 2518282 Российская федерация, МПК C12N 1/20, C12R 1/01. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба: №2013129148/10: заявл. 25.06.2013 : опубл. 10.06.2014 / Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г. [и др.]. – 6 с. : ил.

37. Попова, А.Ю. Эпидемиология и профилактика туляремии на эндемичных территориях России: монография / А. Ю. Попова, В. В. Мефодьев, Т. Ф. Степанова, [и др.]. – Тюмень: ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии», 2016. – 316 с.

38. Романова, Л.В. Некультивируемые формы *Francisella tularensis* / Л.В. Романова, Б.Н. Мишанькин, Н.Л. Пичурина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 2. – С.11–15.

39. Саяпина, Л.В. Совершенствование подходов по верификации вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе длительного хранения / Л. В. Саяпина, Н. А. Осина, Е. А. Нарышкина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 3. – С. 137–144. – DOI 10.21055/0370-1069-2022-3-137-144.

40. Соловьев, Е.А. Характеристика фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с длительными сроками хранения / Е.А. Соловьев, Л.В. Саяпина, Н.А. Осина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – №4. – С. 91–95. – DOI 10.21055/0370-1069-2015-4-91-95.

41. Родионова, И.В. Сравнительный анализ белковых антигенов *Francisella* / И.В. Родионова, В.И. Захаренко // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 1990. – №11. – С. 16–18.

42. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней СанПиН 3.3686-21. – Москва, 2021.

43. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2004. – №

44. – С. 263–306.

44. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования / Мокриевич А. Н. Кравченко Т. Б., Фирстова В. В. [и др.]; под редакцией академика РАН И.А. Дятлова. – Москва: Династия, 2019. – 263 с.

45. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – Москва: Медицина, 1987. – 374с.

46. Шаров, Т.Н. Протеомный анализ в микробиологии / Т.Н. Шаров, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2023. – Т. 41, № 1. – С. 3–9. – DOI 10.17116/molgen2023410113.

47. Щипелева, И.А. Антибактериальная терапия туляремии: современное состояние и перспективы / И.А. Щипелева, Е.И. Марковская, О.Ф. Кретенчук // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65, № 3–4. – С. 39–44.

48. Alam, A. ClpB mutants of Francisella tularensis subspecies holarctica and tularensis are defective for type VI secretion and intracellular replication/ A. Alam, I. Golovliov, E. Javed [et al.] // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8, №1. – DOI 10.1038/s41598-018-29745-4.

49. Alharbi, A. Role of peroxiredoxin of the AhpC/TSA family in antioxidant defense mechanisms of *Francisella tularensis* / A. Alharbi, S.M. Rabadi , M. Alqahtani [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, No. 3. – DOI 10.1371/journal.pone.0213699.

50. Ali, M.M. A DNAzyme-based colorimetric paper sensor for *Helicobacter pylori* / M.M. Ali, M. Wolfe, K. Tram [et al.] // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2019. – Vol. 58. – P. 9907–9911. – DOI 10.1002/anie.201901873.

51. Aloni-Grinstein, R. A rapid real-time quantitative PCR assay to determine the minimal inhibitory extracellular concentration of antibiotics against an intracellular *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain / R. Aloni-Grinstein, O. Shifman, S. Lazar [et al.] // Front Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 1213. – DOI 10.3389/fmicb.2015.01213.

52. Alqahtani, M. Characterization of a unique outer membrane protein required for oxidative stress resistance and virulence of *Francisella tularensis* / M. Alqahtani, Z. Ma, H. Ketkar [et al.] //J. Bacteriol. – 2018. – Vol. 200, No. 8. – P.

e00693-17. – DOI 10.1128/JB.00693-17.

53. Alsteens, D. Multiparametric atomic force microscopy imaging of biomolecular and cellular systems / D. Alsteens, D.J. Müller, Y.F. Dufrêne // Accounts of Chemical Research. – 2017. – Vol. 50. – P. 924–931. – DOI 10.1021/acs.accounts.6b00638.

54. Amenta, J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-bayer chromatography // J. Lipids Res. – 1964. – Vol. 5. – P. 270–275.

55. Ancuta, P. Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins / P. Ancuta, T. Pedron, R. Girard [et al.] // Infect Immun. – 1996. – Vol. 64, No. 6. – P. 2041–2046. – DOI 10.1128/iai.64.6.2041-2046.1996.

56. Arunima, A.M. Role of OB-fold protein YdeI in stress response and virulence of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* / A. Arunima, S.K. Swain, S.D. Patra [et al.] // J. Bacteriol. – 2020. – Vol. 203, No. 1. – P. e00237-20. – DOI 10.1128/JB.00237-20.

57. Averaimo, S. Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): Sensor and effector during oxidative stress / S. Averaimo, R.H. Milton, M.R. Duchen [et al.] // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584. – P. 2076–2084. – DOI 10.1016/j.febslet.2010.02.073.

58. Bae, S. Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide / S. Bae, S.J.A. Wuertz // Appl Environ Microbiol. – 2009. – Vol. 75, No. 9. – P. 2940–2944. – DOI 10.1128/aem.01333-08.

59. Baker, C.N. Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth / C.N. Baker, D.G. Hollis, C. Thornsberry // J. Clin Microbiol. – 1985. – Vol. 22, No. 2. – P. 212–215. – DOI 10.1128/jcm.22.2.212-215.1985.

60. Bandara, A.B. Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice / A.B. Bandara, A.E. Champion, X. Wang [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, No. 4. – P. e19003. – DOI 10.1371/journal.pone.0019003.

61. Bandyopadhyay, D. Computational approach towards the design of novel inhibitor against universal stress protein A to combat multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* / D. Bandyopadhyay, G. Singh, M. Mukherjee, Y. Akhter // J Mol Struct. – 2021. – Vol. 1238. – P. 130379.

62. Baron, G.S. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida* / G.S. Baron, F.E. Nano // Mol Microbiol. – 1998. – Vol. 29, No. 1. – P. 247–259. – DOI 10.1046/j.1365-2958.1998.00926.x.

63. Battesti, A. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli* / A. Battesti, N. Majdalani, S. Gottesman //Annu Rev Microbiol. – 2011. – Vol. 65. – P. 189–213. – DOI 10.1146/annurev-micro-090110-102946.

64. Beutel, S. *In situ* sensor techniques in modern bioprocess monitoring / S. Beutel, S. Henkel // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 91, No. 6. – P. 1493–505. – DOI 10.1007/s00253-011-3470-5.

65. Binesse, J. Roles of reactive oxygen species-degrading enzymes of *Francisella tularensis* SCHU S4 / J. Binesse, H. Lindgren, L. Lindgren [et al.] // Infect. Immun. – 2015. – Vol. 83, No. 6. – P. 2255–2263. – DOI 10.1128/IAI.02488-14.

66. Boes, N. The universal stress protein *Pseudomonas aeruginosa* PA4352 is necessary for survival under anaerobic energy stress / N. Boes, K. Schreiber, E. Härtig [et al.] // J Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, No. 18. – P. 6529–6538. – DOI 10.1128/JB.00308-06.

67. Bonomo, M.G. Development and optimization of a fluorescent differential display PCR system for analyzing the stress response in *Lactobacillus sakei* strains / M.G. Bonomo, M.A. Sico, S. Grieco [et al.] // Nutrients. – 2009. – Vol. 1, No. 2. – P. 210–223. – DOI 10.3390/nu1020210.

68. Bradford, M.K. Immune lymphocytes halt replication of *Francisella tularensis* LVS within the cytoplasm of infected macrophages / M.K. Bradford, K.L. Elkins // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P.12023. – DOI 10.1038/s41598-020-68798-2.

69. Brodmann, M. *Francisella* requires dynamic type VI secretion system and

ClpB to deliver effectors for phagosomal escape / M. Brodmann, R.F. Dreier, P. Broz [et al.] // Nat Commun. – 2017. – Vol. 8, No. 1. – P. 15853. – DOI 10.1038/ncomms15853.

70. Brudal, E. Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR analyses of fish-pathogenic *Francisella* strains exposed to different growth conditions / E. Brudal, , H.C. Winther-Larsen, D.J. Colquhoun, S. Duodu // BMC Res Notes. – 2013. – Vol. 6. – P. 76. – DOI 10.1186/1756-0500-6-76.

71. Buchan, B.W. Identification of *migR*, a regulatory element of the *Francisella tularensis* live vaccine strain *iglABCD* virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages / B.W. Buchan, R.L. McCaffrey, S.R. Lindemann [et al.] // Infect Immun. – 2009. – Vol. 77, No. 6. – P. 2517–2529. – DOI 10.1128/IAI.00229-09.

72. Cangelosi, G.A. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability / G.A. Cangelosi, J.S. Meschke // Appl Environ Microbiol. – 2014. – Vol. 80, No. 19. – P. 5884–5891. – DOI 10.1128/AEM.01763-14.

73. Celli, J. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis / J. Celli, T.C. Zahrt // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2013. – No. 3. – P. a010314. – DOI 10.1101/cshperspect.a010314.

74. Cesar, S. Thinking big: the tunability of bacterial cell size / S. Cesar, K.C. Huang // FEMS Microbiol Rev. – 2017. – Vol. 41, No. 5. – P. 672–678. – DOI 10.1093/femsre/fux026.

75. Chamberlain, R.E. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium / R.E. Chamberlain // Applied Microbiol. – 1965. – No. 13. – P. 232–235.

76. Chan, W.C. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging / W.C. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao [et al.] // Curr Opin Biotechnol. – 2002. – Vol. 13, No.1. – P. 40–46. – DOI 10.1016/s0958-1669(02)00282-3.

77. Chance, T. A spontaneous mutation in *kdsD*, a biosynthesis gene for 3 deoxy-D-manno-octulosonic acid, occurred in a ciprofloxacin resistant strain of *Francisella tularensis* and caused a high level of attenuation in murine models of tularemia / T.

Chance, J. Chua, R.G. Toothman [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, No. 3. – P. e0174106. – DOI 10.1371/journal.pone.0174106.

78. Chandrasekhar, K. Characterisation and structural dynamics of differentially expressed proteins of probiotic *Eschericia coli* Nissle 1917 in response to *Cocos nucifera* / K. Chandrasekhar, B. Sreedevi, S. Sreevani [et al.] // Sap. J. Proteomics Bioinform. – 2014. – Vol. 7, No. 7. – P. 179–185. – DOI 10.4172/0974-276X.1000318.

79. Charity, J.C. Twin RNA polymerase-associated proteins control virulence gene expression in *Francisella tularensis* / J.C. Charity, M.M. Costante-Hamm, E.L. Balon [et al.] // PLoS Pathog. – 2007. – Vol. 3, No. 6. – P. e84. – DOI 10.1371/journal.ppat.0030084.

80. Cherwonogrodzky, J.W. Increased encapsulation and virulence of *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) by subculturing on synthetic medium / J.W. Cherwonogrodzky, M.H. Knodel, M.R. Spence // Vaccine. – 1994. – No. 12. – P. 773–775.

81. Chia, J.S. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR / J.S. Chia, Y.Y. Lee, P.T. Huang [et al.] // Infect Immun. – 2001. – Vol. 69, N 4. – P. 2493–2501. – DOI 10.1128/IAI.69.4.2493-2501.2001.

82. Chiang, E.L.C. Assessment of physiological responses of bacteria to chlorine and UV disinfection using a plate count method, flow cytometry and viability PCR / E.L.C. Chiang, S. Lee, C.A. Medriano [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2022. – Vol. 132, N. 3. – P. 1788–1801. – DOI 10.1111/jam.15325.

83. Clemens, D.L. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops / D.L. Clemens, B.Y. Lee, M.A. Horwitz // Infect Immun. – 2005. – No. 73. – P. 5892–5902. – DOI 10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005.

84. Cowley, S.C. Immunity to *Francisella* / S.C. Cowley, K.L. Elkins // Front Microbiol. – 2011. – Vol. 2. – P. 26. – DOI 10.3389/fmicb.2011.00026.

85. Cuthbert, B.J. Structural and biochemical characterization of the *Francisella tularensis* pathogenicity regulator, macrophage locus protein A (MglA) / B.J. Cuth-

bert, R.G. Brennan, M.A. Schumacher // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, No. 6. – P. e0128225. – DOI 10.1371/journal.pone.0128225.

86. Cuthbert, B.J. Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis* / B.J. Cuthbert, W. Ross, A.E. Rohlfing [et al.] // Genes Dev. – 2017. – Vol. 31, No 15. – 1549-1560. – DOI 10.1101/gad.303701.117.

87. Da Silva G.J. Interplay between colistin resistance, virulence and fitness in *Acinetobacter baumannii* / G.J. Da Silva, S. Domingues // Antibiotics (Basel). – 2017. – Vol. 6, No. 4. – P. 28. – DOI 10.3390/antibiotics6040028.

88. De Bruin, O.M. The *Francisella* pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth / O.M. de Bruin, J.S. Ludu, F.E. Nano // BMC Microbiol. – 2007. – Vol. 7. – P. 1. – DOI 10.1186/1471-2180-7-1.

89. Dedysh, S.N. Describing difficult-to-culture bacteria: taking a shortcut or investing time to discover something new? / S.N. Dedysh // Syst Appl Microbiol. – 2023. – Vol. 46, No. 5. – P. 126439. – DOI 10.1016/j.syapm.2023.126439.

90. Dufrêne, Y.F. AFM in cellular and molecular microbiology / Y.F. Dufrêne, A. Viljoen, J. Mignolet, M. Mathelié-Guinlet // Cell Microbiol. – 2021. – Vol. 23, No. 7. – P. e13324. – DOI 10.1111/cmi.13324.

91. Elhosseiny, N.M. *Acinetobacter baumannii* universal stress protein A plays a pivotal role in stress response and is essential for pneumonia and sepsis pathogenesis / N.M. Elhosseiny, M.A. Amin, A.S. Yassin [et al.] // Int J Med Microbiol. – 2015. – Vol. 305, No. 1. – P. 114–123. – DOI 10.1016/j.ijmm.2014.11.008.

92. Ericsson, M. Increased synthesis of DnaK, GroEl, and GroEs homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogen peroxide / M. Ericsson, A. Tärnvik, K. Kuoppa [et al.] // Infect Immun. – 1994. – Vol.62, No.1. – P. 178–183. – DOI 10.1128/iai.62.1.178-183.1994.

93. Eshraghi, A. Secreted effectors encoded within and outside of the *Francisella* pathogenicity island promote intramacrophage growth / A. Eshraghi, J. Kim, A.C. Walls [et al.] //. Cell Host Microbe. – 2016. – Vol. 20, No. 5. – P. 573–583. – DOI

10.1016/j.chom.2016.10.008.

94. Ezraty, B. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria / B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras [et al.] // Nat Rev Microbiol. – 2017. – Vol. 15. – P. 385–396. – DOI 10.1038/nrmicro.2017.26.

95. Feliciello, I. Regulation of *ssb* Gene Expression in *Escherichia coli* / I. Feliciello, E. Đermić, H. Malović [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23, No. 18. – P. 10917. – DOI 10.3390/ijms231810917.

96. Fletcher, J.R. The ability to acquire iron is inversely related to virulence and the protective efficacy of *Francisella tularensis* live vaccine strain / J.R. Fletcher, D.D. Crane, T.D. Wehrly [et al.] // Front Microbiol. – 2018. – No. 9. – P. 607. – DOI 10.3389/fmicb.2018.00607.

97. Forsman, M. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR / M. Forsman, G. Sandström, A. Sjöstedt // Int J Syst Bacteriol. – 1994. – Vol. 44, No. 1. – P. 38–46. – DOI 10.1099/00207713-44-1-38.

98. Freudenberger Catanzaro. K.C. The *Francisella tularensis* polysaccharides: what is the real capsule? / K.C. Freudenberger Catanzaro, T.J. Inzana // Microbiol Mol Biol Rev. – 2020. – Vol. 84, No. 1. – DOI 10.1128/MMBR.00065-19.

99. Galindo Blaha, C.A. An *Azospirillum brasilense* Tn5 mutant with modified stress response and impaired in flocculation / C.A. Galindo Blaha, I.S. Schrank // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2003. – Vol. 83, No. 1. – P. 35–43. – DOI 10.1023/a:1022937828186.

100. Geisbert, T.W. Use of immunoelectron microscopy to demonstrate *Francisella tularensis* / T.W. Geisbert, P.B. Jahrling, J.W. Jr. Ezzell // J Clin Microbiol. – 1993. – Vol. 31, No. 7. – P. 1936–1939. – DOI 10.1128/jcm.31.7.1936-1939.1993.

101. Golovliov, I. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells / I. Golovliov, V. Baranov, Z. Krocova [et al.] // Infect Immun. – 2003. – No. 71. – P. 5940–5950.

102. Grall, N. Pivotal role of the *Francisella tularensis* heat-shock sigma factor

RpoH / N. Grall, J. Livny, M. Waldor [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, No. 8. – P. 2560–2572. – DOI 10.1099/mic.0.029058-0.

103. Grossman, A.D. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters / A.D. Grossman, J.W. Erickson, C.A. Gross // Cell. – 1984. – Vol. 38. – P. 383–389. – DOI 10.1016/0092-8674(84)90493-8.

104. Güler, E. Investigation of *Francisella tularensis* seroprevalence and determination of risk factors for tularemia among hunters in Northern Cyprus / E. Güler, M. Güvenir, B. Korbay et al. // J Arthropod Borne Dis. – 2024. – Vol. 18, No. 1. – P. 47–56. – DOI 10.18502/jad.v18i1.15671.

105. Guo, M. Bacterioferritin nanocage: structure, biological function, catalytic mechanism, self-assembly and potential applications / M. Guo, M. Gao, J. Liu [et al.] // Biotechnol Adv. – 2022. – Vol. 61. – P. 108057. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2022.108057.

106. Haas, A. The phagosome: compartment with a license to kill / A. Haas // Traffic. – 2007. – Vol. 8, No 4. – P. 311–330. – DOI 10.1111/j.1600-0854.2006.00531.x.

107. Hattori, T. The viable count: quantitative and environmental aspects / T. Hattori. – Berlin: Springer-Verlag, 1988. – 88 p.

108. Haurat, M. F. Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles / M. F. Haurat, W. Elhenawy, M. F. Feldman // Biol. Chem. – 2015. – No. 396. – P. 95–109. – DOI 10.1515/hsz-2014-0183.

109. Havis, S. A universal stress protein that controls bacterial stress survival in *Micrococcus luteus* / S. Havis, A. Bodunrin, J. Rangel [et al.] // J. Bacteriol. – 2019. – Vol. 201. – P. e00497-19. – DOI 10.1128/JB.00497-19.

110. Hemm, M.R. Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies / M.R. Hemm, B.J. Paul, J. Miranda-Ríos [et al.] // J Bacteriol. – 2010. – Vol. 192, No. 1. – P 46–58. – DOI 10.1128/JB.00872-09.

111. Hennebique, A. Amoebae can promote the survival of *Francisella* species in the aquatic environment / A. Hennebique, J. Peyroux, C. Brunet [et. al.] // Emerging. Microbes & Infections. – 2021. – Vol. 10, No. 1. P. 277–290. – DOI

10.1080/22221751.2021.1885999.

112. Hoffman, P.S. *Legionella pneumophila htpAB* heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60kDa antigen in *L. pneumophila*-infected HELA cells / Hoffman P.S., Houston L., Butler C.A. // Infect. And Immun. – 1990. – Vol. 58, No. 10. – P. 3380–3387. – DOI 10.1128/iai.58.10.3380-3387.1990.

113. Honn, M. Lack of OxyR and KatG results in extreme susceptibility of *Francisella tularensis* LVS to oxidative stress and marked attenuation *in vivo* / M. Honn, H. Lindgren, G.K. Bharath, A. Sjöstedt // Front Cell Infect Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – P. 14. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00014.

114. Hotta, A. *In vitro* antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan / A. Hotta, O. Fujita, A. Uda [et al.] // Jpn J Infect Dis. – 2013. – Vol. 66, No. 6. – P. 534–536. – DOI 10.7883/yoken.66.534.

115. Ibrahim, S.F. Flow cytometry and cell sorting. / S.F. Ibrahim, G. van den Engh // Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2007. – Vol. 106. – P. 19–39. – DOI 10.1007/10-2007-073.

116. Ignatov, O.V. Detection of microbial cells with electrooptical analysis / O.V. Ignatov, O.I. Guliy, V.D. Bunin [et al.] // Defense against Bioterror. NATO Security through Science Series. Springer, Dordrecht. – 2004. – P. 147–163. – DOI 10.1007/1-4020-3384-2_12.

117. Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage / J.A. Imlay // Annu Rev Microbiol. – 2003. – Vol. 57. – P. 395–418. – DOI 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.

118. Iino, H. Crystal structure of the tandem-type universal stress protein TTHA0350 from *Thermus thermophilus* HB8 / H. Iino, N. Shimizu, M. Goto [et al.] // J. Biochem. – 2011. – Vol. 150. – P. 295–302. – DOI 10.1093/jb/mvr057.

119. Intelicato-Young, J. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria / J. Intelicato-Young, A. Fox // J Microbiol Methods. – 2013. – Vol. 92, No. 3. – P. 381–386. – DOI 10.1016/j.mimet.2013.01.004.

120. Irving, S.E. Triggering the stringent response: signals responsible for acti-

vating (p)ppGpp synthesis in bacteria / S.E. Irving, R.M. Corrigan // Microbiology . – 2018. – Vol. 164, No.3. – P. 268–276. – DOI 10.1099/mic.0.000621.

121. Jain, A. Deciphering plant-microbe crosstalk through proteomics studies / A. Jain, H.B. Singh, S. Das // Microbiol Res. – 2021. – Vol. 242. – P. 126590. – DOI 10.1016/j.micres.2020.

122. Junne, S. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic *Escherichia coli* batch cultivations / S. Junne, M.N. Cruz-Bournazou, A. Angersbach [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – No. 37. – P. 935–942. – DOI 10.1007/s10295-010-0742-5.

123. Juntachai, W. Ambient pH regulates secretion of lipases in *Malassezia furfur* / W. Juntachai, A. Chaichompoo, S. Chanarat // Microbiology. – 2020. – Vol. 166, No. 3. – P. 288–295. – DOI 10.1099/mic.0.000879.

124. Kanno, M. pH-induced change in cell susceptibility to butanol in a high butanol-tolerant bacterium, *Enterococcus faecalis* strain CM4A / M. Kanno, H. Tamaki, Y. Mitani [et al.] // Biotechnol Biofuels. – 2015; – No. 8. – P.69. – DOI 10.1186/s13068-015-0251-x.

125. Kauldhar, B.S. Tailoring nutritional and process variables for hyperproduction of catalase from a novel isolated bacterium *Geobacillus* sp. BSS-7 / B.S. Kauldhar, B.S. Sooch // Microb Cell Fact. – 2016. – Vol. 15, No 7. – DOI 10.1186/s12934-016-0410-1.

126. Keller, M. Tapping into microbial diversity / M. Keller, K. Zengler // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2. – P. 141–150.

127. Khoris, I.M. Advancement of capture immunoassay for real-time monitoring of hepatitis E virus-infected monkey / I.M. Khoris, A.D. Chowdhury, T.C. Li [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2020. – Vol. 1110. – P. 64–71. – DOI 10.1016/j.aca.2020.02.020.

128. Khrustalev, V.V. Spectra of tryptophan fluorescence are the result of coexistence of certain most abundant stabilized excited state and certain most abundant destabilized excited state / V.V. Khrustalev, T.A. Khrustaleva, V.V. Poboinev [et al.] // Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. – 2021. – Vol.5, No. 257. – P. 119784. –

DOI 10.1016/j.saa.2021.119784.

129. Kilmury, S.L.N. The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies / S.L.N. Kilmury, S.M. Twine // Front. Microbiol. – 2011. – Vol. 1. – P. 143. – DOI 10.3389/fmicb.2010.00143.

130. Kim, K.S. Genome-wide multi-omics analysis reveals the nutrient-dependent metabolic features of mucin-degrading gut bacteria / K.S. Kim, E. Tiffany, J.Y. Lee [et al.] // Gut Microbes. – 2023. – Vol. 15, No. 1. – P. 2221811. – DOI 10.1080/19490976.2023.2221811.

131. Kingry, L.C. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida* / L.C. Kingry, J.M. Petersen // Front Cell Infect Microbiol. – 2014. – Vol. 13, No. 4. – P. 35. – DOI 10.3389/fcimb.2014.00035.

132. Klinman, D.M. Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? / D.M. Klinman, D. Verthelyi, F. Takeshita, K.J. Ishii // Immunity. – 1999. – Vol. 11, No.2. – P. 123–129. – DOI 10.1016/s1074-7613(00)80087-4.

133. Kojabad, A.A. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives / A.A. Kojabad, M. Farzanehpour, H.E.G. Galeh [et al.] // J Med Virol. – 2021. – Vol. 93, No. 7. – P. 4182–4197. – DOI 10.1002/jmv.26846.

134. Kramer, B. Effect of pulsed light on structural and physiological properties of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* / B. Kramer, P. Muranyi // J Appl Microbiol. – 2014. – Vol. 116, No. 3. – P. 596–611. – DOI 10.1111/jam.12394.

135. Kramer, J. Bacterial siderophores in community and host interactions / J. Kramer, Ö. Özkaya, R. Kümmerli. // Nat Rev Microbiol. – 2020. – Vol. 18, No. 3. – P. 152–163. – DOI 10.1038/s41579-019-0284-4.

136. Kubelkova, K. *Francisella* and antibodies / K. Kubelkova, A. Macela // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9, No. 10. – P. 2136. – DOI 10.3390/microorganisms9102136.

137. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, No. 5259. – P. 680–685. – DOI 10.1038/227680a0.

138. Larsson, P. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia / P. Larsson, P.C. Oyston, P. Chain [et al.] // Nat Genet. – 2005. – No. 37. – P. 153–159.

139. Lee B. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis* / B.Lee, M.A. Horwitz, D.L. Clemens // Infect Immun. – 2006. – Vol.74, No. 7. – P. 4002–4013. – DOI 10.1128/IAI.00257-06.

140. Lee, S. Evaluating the newly developed dye, DyeTox13 Green C-2 Azide, and comparing it with existing EMA and PMA for the differentiation of viable and non-viable bacteria / S. Lee, S. Bae // J Microbiol Methods. – 2018. – Vol. 148. – P. 33–39. – DOI 10.1016/j.mimet.2018.03.018.

141. Leme, J. A multivariate calibration procedure for UV/VIS spectrometric monitoring of BHK-21 cell metabolism and growth / J. Leme, E.G. Fernández Núñez, L. de Almeida Parizotto [et. al.] // Biotechnol Prog. – 2014. – Vol. 30, No. 1. – P. 241–248. – DOI 10.1002/btpr.1847.

142. Leshchiner, D. A genome-wide atlas of antibiotic susceptibility targets and pathways to tolerance / D. Leshchiner, F. Rosconi, B. Sundaresh [et al.] // Nat Commun. – 2022. – Vol. 13, No. 1. – P. 3165. – DOI 10.1038/s41467-022-30967-4.

143. Li, X. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery / X. Li, X. Kong, S. Shi [et al.] //BMC Biotechnol. – 2008. – Vol. 8. – P. 89. – DOI 10.1186/1472-6750-8-89.

144. Lindgren, M. The *Francisella tularensis* LVS *ΔpdpC* mutant exhibits a unique phenotype during intracellular infection / M. Lindgren, J.E. Broms, L. Meyer [et al.] // BMC Microbiol. – 2013. – Vol. 13, No. 1. – P. 20. – DOI 10.1186/1471-2180-13-20.

145. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25, No. 4. – P. 402–408.

146. López, D. Biofilms / D. López, H. Vlamakis, R. Kolter // Cold Spring Harb

Perspect Biol. – 2010. – Vol. 2, No. 7. – P. a000398. – DOI 10.1101/cshperspect.a000398.

147. Loveless, B.M. Identification of ciprofloxacin resistance by simple probe, high resolution melt and pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis* / B.M. Loveless, A. Yermakova, D.R. Christensen [et al.] // Mol Cell Probes. – 2010. – Vol. 24, No.3. – P. 154–160. – DOI 10.1016/j.mcp.2010.01.003.

148. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Risebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol Chem. – 1951. Vol. 193. – P. 265.

149. Luo, D. Universal stress proteins: from gene to function / D. Luo, Z. Wu, Q. Bai [et al.] // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24, No.5. – P. 4725. – DOI 10.3390/ijms24054725.

150. Lyamin, A.V. Comparison of protein profiles obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry in representatives of the family *Mycobacteriaceae* grown on various nutrient media / A.V. Lyamin, M.O. Zolotov, A.V. Kozlov [et al.] // Int J Mycobacteriol. – 2023. – Vol. 12, No.3. – P. 305–309. – DOI 10.4103/ijmy.ijmy_137_23.

151. Ma, Z. Elucidation of a mechanism of oxidative stress regulation in *Francisella tularensis* live vaccine strain / Z. Ma, V.C. Russo, S.M. Rabadi [et al.] // Mol Microbiol. – 2016. – Vol. 101, No. 5. – P. 856–878. – DOI 10.1111/mmi.13426.

152. Ma, Z. Stringent response governs the oxidative stress resistance and virulence of *Francisella tularensis* / Z. Ma, K. King, M. Alqahtani [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, No. 10. – P. e0224094. – DOI 10.1371/journal.pone.0224094.

153. Maier, L. Unravelling the collateral damage of antibiotics on gut bacteria / L. Maier, C.V. Goemans, J. Wirbel [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 599, No. 7883. – P. 120–124. – DOI 10.1038/s41586-021-03986-2.

154. Mahajan, G. Using structural knowledge in the protein data bank to inform the search for potential host-microbe protein interactions in sequence space: application

to *Mycobacterium tuberculosis* / G. Mahajan, S.C. Mande // BMC Bioinformatics. – 2017. – Vol. 18, No. 1. – P. 201. – DOI 10.1186/s12859-017-1550-y.

155. Manning, A.J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense / A.J. Manning, M.J. Kuehn // BMC Microbiol. – 2011. – Vol. 11. – P. 258. – DOI 10.1186/1471-2180-11-258.

156. Maqbool, I. Understanding the survival mechanisms of *Deinococcus radiodurans* against oxidative stress by targeting thioredoxin reductase redox system / I. Maqbool, V. Ponniresan, K. Govindasamy [et al.] // Arch Microbiol. – 2020. – Vol. 202, No. 9. – P. 2355–2366. – DOI 10.1007/s00203-019-01729-6.

157. Marghani, D. An AraC/XylS family transcriptional regulator modulates the oxidative stress response of *Francisella tularensis* / D. Marghani, Z. Ma, A.J. Centone [et al.] // J Bacteriol. – 2021. – Vol. 203, No. 23. –P. e0018521. – DOI 10.1128/JB.00185-21.

158. McCaig, W.D. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida* / W.D. McCaig, A. Koller, D.G. Thanassi // J. Bacteriol. – 2013. – No. 195. – P. 1120–1132. – DOI 10.1128/JB.02007-12.

159. Meibom, K.L. The heat-shock protein ClpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice / K.L. Meibom, I. Dubail, M. Dupuis [et al.] // Mol Microbiol. – 2008. – Vol. 67, No. 6. – P. 1384–1401. – DOI 10.1111/j.1365-2958.2008.06139.x.

160. Melike, S. Fast and safe method for *Francisella tularensis* detection with electrochemical sensor using graphene quantum dots as nanozymes / S. Melike, A. Novel // SSRN. – 2023. – DOI 10.2139/ssrn.4428705.

161. Melillo, A. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells / A. Melillo, D.D. Sledjeski, S. Lipski [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2006. – Vol. 263, No. 1. – P. 102–108. – DOI 10.1111/j.1574-6968.2006.00413.x.

162. Metaane, S. Loss of CorA, the primary magnesium transporter of *Salmonella*, is alleviated by MgtA and PhoP-dependent compensatory mechanisms / S.

Metaane, V. Monteil, T. Douché [et al.] // PLoS One. – 2023. – Vol. 18, No. 9. – P. e0291736. – DOI 10.1371/journal.pone.0291736.

163. Mörner, T. The ecology of tularemia / T. Mörner // Rev Sci Tech. – 1992. – Vol. 11. – P. 1123–1130.

164. Mshana, R.N. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / R.N. Mshana, G. Tadesse, G. Abate, H. Miörner // J Clin Microbiol. – Vol. 36, No 5. – P. 1214-1219. – DOI 10.1128/jcm.36.5.1214-1219.1998.

165. Mykytczuk, N.C.S. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress / N.C.S. Mykytczuk, J.T. Trevors, L.G. Leduc [et al.] // Prog Biophys Mol Biol. – 2007. – Vol. 95. – P. 60–82.

166. Müller, S. Recent advances in the analysis of individual microbial cells / S. Müller, H. Davey // Cytometry. – 2009. – Vol. 75A. – P. 83–85. – DOI 10.1002/cyto.a.20702.

167. Müller, W. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity / W. Müller, H. Hotzel, P. Otto [et al.] // BMC Microbiol. – 2013. – No. 13. – P. 61. – DOI 10.1186/1471-2180-13-61.

168. Murphy, K.M. Janeway's Immunobiology, 9th ed. / K.M. Murphy, C. Weaver. – New York: W.W. Norton & Company, 2017. – 904 p.

169. Myers, J.A. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density / J.A. Myers, B.S. Curtis, W.R. Curtis // BMC Biophys. – 2013. – Vol. 6, No. 4. – DOI 10.1186/2046-1682-6-4.

170. Nabi, B. Molecular, structural, and functional diversity of universal stress proteins (USPs) in bacteria, plants, and their biotechnological applications / B. Nabi, M. Kumawat, N. Ahlawat, S. Ahlawat // Protein J. – 2024. – Vol. 43, No. 3. – P. 437-446. – DOI 10.1007/s10930-024-10192-2.

171. Nachin, L. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility / L. Nachin, U. Nannmark, T.

Nyström // J Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, No. 18. – P. 6265–6272. DOI 10.1128/JB.187.18.6265-6272.2005.

172. Nano, F.E. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth / F.E. Nano, N. Zhang, S.C. Cowley [et al.] // J Bacteriol. – 2004. – Vol. 186, No. 19. – P. 6430–6436. – DOI 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004.

173. Nano, F.E. The *Francisella* pathogenicity island / F.E. Nano, C. Schmerk //Ann N Y Acad Sci. – 2007. – Vol. 1105. – P. 122–137. – DOI 10.1196/annals.1409.000.

174. Nebe-von-Caron, G. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting / G. Nebe-von-Caron, P.J. Stephens, C.J. Hewitt [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2000. – Vol. 42. – P. 97–114.

175. Noah, C.E. GroEl and lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain synergistically activate human macrophages / C.E. Noah, M. Malik, D.C. Bublitz [et al.] // Infect Immun. – 2010. – Vol. 78, No.4. – P. 1797–1806. – DOI 10.1128/IAI.01135-09.

176. Nievergelt, A.P. High-speed photothermal off-resonance atomic force microscopy reveals assembly routes of centriolar scaffold protein SAS-6 / A.P. Nievergelt, N. Banterle, S.H. Andany [et al.] // Nature Nanotechnology. – 2018. – Vol. 13. – P. 696–701. – DOI 10.1038/s41565-018-0149-4.

177. Nyström, T. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli* / T. Nyström, F.C. Neidhardt // Mol Microbiol. – 1992. – Vol. 6, No. 21. – P. 3187–3198. – DOI 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01774.x.

178. Okan, N.A. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella* / N.A. Okan, D.L. Kasper // Carbohydr Res. – 2013. – Vol. 378. – P. 79–83. – DOI 10.1016/j.carres.2013.06.015.

179. O'Toole, R. Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis* / R. O'Toole, H.D. Williams // Res. Microbiol. – 2003. – Vol. 154. – P. 387–392. – DOI 10.1016/S0923-2508(03)00081-0.

180. Pacios, O. (p)ppGpp and its role in bacterial persistence: new challenges. / O. Pacios, L. Blasco, I. Bleriot [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2020. – Vol. 64, No. 10. – P. e01283-20. – DOI 10.1128/AAC.01283-20.

181. Pauly, H. Electrical properties of the cytoplasmic membrane and the cytoplasm of bacteria and of protoplasts / H. Pauly // Ire Trans Biomed Electron. – 1962. – No. 9. – P. 93–95. – DOI 10.1109/tbmel.1962.4322970.

182. Pérez, N. Two parallel pathways for ferric and ferrous iron acquisition support growth and virulence of the intracellular pathogen *Francisella tularensis* Schu S4 / N. Pérez, R. Johnson, B. Sen [et al.] // Microbiologyopen. – 2016. – Vol. 5, No.3. – P. 453–468. – DOI 10.1002/mbo3.342.

183. Peters, S. Click-correlative light and electron microscopy (click-AT-CLEM) for imaging and tracking azido-functionalized sphingolipids in bacteria / S. Peters, L. Kaiser, J. Fink [et. al.] // Sci Rep. – 2021. – Vol. 22, No. 11(1). – P. 4300. – DOI 10.1038/s41598-021-83813-w.

184. Pierson, T. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine / T. Pierson, D. Matrakas, Y.U. Taylor [et al.] // J. Proteome Res. – 2011. – Vol.10, No. 3. – P. 954–967. – DOI 10.1021/pr1009756.

185. Postgate, J.R. Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress / J.R. Postgate // Adv. Microb. Physiol. – 1967. – Vol. 1. – P. 1–23.

186. Postgate, J.R. Viable counts and viability / J.R. Postgate// Methods Microbiol. – 1969. – Vol. 1. – P. 611–628.

187. Qi, H.Z. Antioxidative system of *Deinococcus radiodurans* / H.Z. Qi, W.Z. Wang, J.Y. He [et al.] // Research in microbiology. – 2020. – Vol. 171, No. 2. – P. 45–54. – DOI 10.1016/j.resmic.2019.11.002.

188. Radlinski L.C. Defining the metabolic pathways and host-derived carbon substrates required for *Francisella tularensis* intracellular growth / L.C. Radlinski, J. Brunton, S. Steele [et al.] // mBio. – 2018. – Vol. 20, No. 9(6). – P. e01471–18. – DOI 10.1128/mBio.01471-18.

189. Ramakrishnan, G. Iron and virulence in *Francisella tularensis* / G. Ramakrishnan // Front Cell Infect Microbiol. – 2017. – No. 7. – P. 107. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00107.

190. Ramakrishnan, G. Citryl ornithine is an intermediate in a three-step biosynthetic pathway for rhizoferrin in *Francisella* / G. Ramakrishnan, N.M. Pérez, C. Carroll // ACS Chem Biol. – 2019. – Vol. 14, No. 8. – P. 1760–1766. – DOI 10.1021/acschembio.9b00297.

191. Raynaud, C. Role of the *wbt Francisella tularensis* in lipopolysaccharide O-antigen biogenesis and pathogenicity / C. Raynaud, K.L. Meibom, M. Lety [et al.] // Infect Immun. – 2007. – Vol. 75, No. 1. – P. 536–541. – DOI 10.1128/IAI.01429-06.

192. Reese, K.L. Metabolic profiling of volatile organic compounds (VOCs) emitted by the pathogens *Francisella tularensis* and *Bacillus anthracis* in liquid culture / K.L. Reese, A. Rasley, J.R. Avila [et al.] //. Sci Rep. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 9333. – DOI 10.1038/s41598-020-66136-0.

193. Renoud, S. Field site-specific effects of an *Azospirillum* seed inoculant on key microbial functional groups in the rhizosphere / S. Renoud, J. Vacheron, D. Abrouk [et al.] // Front Microbiol. – 2022. – Vol. 12. – P. 760512. – DOI 10.3389/fmicb.2021.760512.

194. Rigamonti, S. *Francisella novicida* infection in a patient with pulmonary infection and pancreatitis in Italy / S. Rigamonti, E. Olivieri, N. Vicari [et al.] // IDCases. – 2024. – Vol. 37. – P. e02038. – DOI 10.1016/j.idcr.2024.e02038.

195. Ritchie, M.D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions / M.D. Ritchie, E.R. Holzinger, R. Li [et al.] // Nat Rev Genet. – 2015. – Vol. 16, No. 2. – P. 85–97. – DOI 10.1038/nrg3868.

196. Ritossa, F. Discovery of the heat shock response / F. Ritossa // Cell Stress Chaperones. – 1996. – Vol. 1, No. 2. – P. 97–98. – DOI 10.1379/1466-1268(1996)001<0097:dothsr>2.3.co;2.

197. Robert, C.B. Mass spectrometry analysis of intact *Francisella* bacteria identifies lipid A structure remodeling in response to acidic pH stress / C.B. Robert, M.

Thomson, A. Vercellone [et al.] // Biochimie. – 2017. – Vol. 141. – P. 16–20. – DOI 10.1016/j.biochi.2017.08.008.

198. Rouco, C. Vole outbreaks may induce a tularemia disease pit that prevents Iberian hare population recovery in NW Spain / C. Rouco, J.J. Luque-Larena, D. Vidal [et al.] // Sci Rep. – 2023. – Vol. 8, No. 13. – P. 3898.

199. Rowe, H.M. From the outside-in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence / H.M. Rowe, J.F. Huntley // Front Cell Infect Microbiol. – 2015. – Vol. 23, No. 5. – P. 94. – DOI 10.3389/fcimb.2015.00094.

200. Sammak, R.L. Investigation of tularemia outbreak after natural infection of Outdoor-Housed rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with *Francisella tularensis* / R.L. Sammak, D.D. Rejmanek, T.M. Roth, K.L. [et al.] // Comparative Medicine. – 2013. – Vol. 63, No. 2. – P. 183–190.

201. Sampath, V. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella* / V. Sampath, W.D. McCaig, D.G. Thanassi // Mol. Microbiol. – 2018. – No. 107. – P. 523–541. – DOI 10.1111/mmi.13897.

202. Sato, Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* resists reactive oxygen species and survives in macrophages / Y. Sato, Y. Unno, C. Miyazaki [et al.] // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9, No. 1. – P. 17462. – DOI 10.1038/s41598-019-53846-3.

203. Schmerk, C.L. Characterization of the pathogenicity island protein PdpA and its role in the virulence of *Francisella novicida* / C.L. Schmerk, B.N. Duplantis, D. Wang [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155, No. 5. – P. 1489–1497. – DOI 10.1099/mic.0.025379-0.

204. Schott, A.S. MALDI-TOF mass spectrometry enables a comprehensive and fast analysis of dynamics and qualities of stress responses of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 / A.S. Schott, J. Behr, J. Quinn [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol.11, No. 10. – P. e0165504. – DOI 10.1371/journal.pone.0165504.

205. Schumann, W. Regulation of bacterial heat shock stimulons / W. Schumann // Cell Stress Chaperones. – 2016. – Vol. 21, No. 6. – P. 959–968. – DOI

10.1007/s12192-016-0727-z.

206. Sen, A. How microbes defend themselves from incoming hydrogen peroxide / A. Sen, J.A. Imlay // Front Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 667343. – DOI 10.3389/fimmu.2021.667343.

207. Srivastava, S.K. 16 kDa heat shock protein from heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* is a homodimer - suitability for diagnostic applications with specific llama VHH monoclonals / S.K. Srivastava, V.J. Ruigrok, N.J. Thompson [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 30, No. 8. – P. e64040. – DOI 10.1371/journal.pone.0064040.

208. Sjöstedt, A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis* / A. Sjöstedt // Curr Opin Microbiol. – 2003. – Vol. 6, No. 1. – P. 66–71. – DOI 10.1016/s1369-5274(03)00002-x.

209. Šrajer Gajdošik, M. Proteomic analysis of food borne pathogens following the mode of action of the disinfectants based on pyridoxal oxime derivatives / M. Šrajer Gajdošik, U. Andjelković, D. Gašo-Sokač [et al.] // Food Res Int. – 2017. – Vol. 99, No. 1. – P. 560–570. – DOI 10.1016/j.foodres.2017.06.016.

210. Steinchen, W. ppGpp: magic modulators of bacterial physiology and metabolism / W. Steinchen, V. Zegarra, G. Bange // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – DOI 10.3389/fmicb.2020.02072.

211. Steiner, D.J. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity / D.J. Steiner, Y. Furuya, D.W. Metzger // Infect. Drug Resist. – 2014. – No. 7. – P. 239–251.

212. Stockert, J.C. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives / J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo [et al.] // Acta Histochem. – 2018. – Vol. 120, No. 3. – P. 159–167. – DOI 10.1016/j.acthis.2018.02.005.

213. Storz, G. Bacterial defenses against oxidative stress / G. Storz, L.A. Tartaglia, S.B. Farr [et al.] // Trends Genet. – 1990. – Vol. 6. – P. 363–368.

214. Suh, K.S. The organellular chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis / K.S. Suh,

M. Mutoh, K. Nagashima [et al.] //J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 4632–4641. – DOI 10.1074/jbc.M311632200.

215. Surur, A.K. Exploring catalase inhibition as an adjuvant to antimicrobial photodynamic therapy against *Staphylococcus aureus* / A.K. Surur, R.L. de Santana, A.L. Palhares [et al.] // Photochem Photobiol Sci. – 2025. – Vol. 24, No. 6. – P. 1053-1068. DOI 10.1007/s43630-025-00735-6.

216. Telford, S.R. Ecology of *Francisella tularensis* / S.R. Telford, H.K. Goethert // Annu Rev Entomol. – 2020. – Vol. 7, No. 65. – P. 351–372. – DOI 10.1146/annurev-ento-011019-025134.

217. Thelaus. J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* occurs in swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding / J. Thelaus, A. Andersson, T. Broman [et.al.] // Microb. Ecol. – 2014. – Vol. 67, No. 1. – P. 96–107. – DOI 10.1007/s00248-013-0285-1.

218. Tian, D. Protective effects of the *Francisella tularensis ΔpdpC* mutant against its virulent parental strain SCHU P9 in cynomolgus macaques / Tian D, Uda A, Ami Y, et al. // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9, No. 1. – P. 9193. – DOI 10.1038/s41598-019-45412-8.

219. Tomaso, H. Antibiotic susceptibility *in vitro* of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolates from Germany / H. Tomaso, H. Hotzel, P. Otto [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2017. – Vol. 72, No. 9. – P. 2539–2543. – DOI 10.1093/jac/dkx182.

220. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1979. – Vol. 76, No. 9. – P. 4350–4354. – DOI 10.1073/pnas.76.9.4350.

221. Travis, B.A. Structural basis for virulence activation of *Francisella tularensis* / B.A. Travis, K.M. Ramsey, S.M. Prezioso [et al.] // Mol Cell. – 2021. – Vol. 81, No. 1. – P. 139–152. – DOI 10.1016/j.molcel.2020.10.035.

222. Trent, M.S. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis / M.S. Trent, C.M. Stead, A.X. Tran [et al.] // J Endotoxin Res. – 2006. – Vol. 12, No. 4. – P. 205–223. – DOI 10.1179/096805106X118825.

223. Ulber, R. Optical sensor systems for bioprocess monitoring / R. Ulber, J.G. Frerichs, S. Beutel // Anal Bioanal Chem. – 2003. – Vol. 376, No. 3. – P. 342–348. – DOI 10.1007/s00216-003-1930-1.

224. Uribe-Querol, E. Control of phagocytosis by microbial pathogens / E. Uribe-Querol, C. Rosales // Frontiers in immunology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1368. – DOI 10.3389/fimmu.2017.01368.

225. Van de Vossenberg, J.L.C.M. Adaptations of the cell membrane for life in extreme environments / J.L.C.M. Van de Vossenberg, A.J.M. Driessen, W.N. Konings // Environmental Stressors and Gene Responses. – 2000. – P. 71–88. – DOI 10.1016/s1568-1254(00)80008-x.

226. Vranakis, I. Quantitative proteome profiling of *C. burnetii* under tetracycline stress conditions / I. Vranakis, P.J. De Bock, A. Papadioti [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, No. 3. – P. e33599. – DOI 10.1371/journal.pone.0033599.

227. Vriezen, Ja.C. Desiccation induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021 / Ja.C. Vriezen, F.J. de Bruijn, K.R. Nusslein // AMB Express. – 2012. – Vol. 2. – P. 6. – DOI 10.1186/2191-0855-2-6.

228. Wang, M. Novel fluorescence-based method for rapid quantification of live bacteria in river water and treated wastewater / M. Wang, M. Ateia, Y. Hatano [et al.] // Env Sci Adv. – 2022. – Vol. 1, No. 1. – P. 30–36. – DOI 10.1039/d1va00017a.

229. Wayne, L.G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease / L.G. Wayne // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1994. – Vol. 13. – P. 908–914.

230. Wehrly, T.D. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages / T.D. Wehrly, A. Chong, K. Virtaneva [et al.] // Cell Microbiol. – 2009. – No. 11. – P. 1128–1150. – DOI 10.1111/j.1462-5822.2009.01316.x.

231. Wick, R.R. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short

and long sequencing reads / R.R. Wick, L.M. Judd, C.L. Gorrie, K.E. Holt // PLoS Comput Biol. – 2017. – Vol. 13, No. 6. – P. e1005595. – DOI 10.1371/journal.pcbi.1005595.

232. Yoon, H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation / H. Yoon // J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 26, No. 8. – P. 1343–1347. – DOI 10.4014/jmb.1604.04080.

233. Zarembinski, T.I. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics / T.I. Zarembinski, L.W. Hung, H.J. Mueller-Dieckmann [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – Vol 95, No. 26. – P. 15189–15193. – DOI 10.1073/pnas.95.26.15189.

234. Zhang, Y. Metagenomics: a new way to illustrate the crosstalk between infectious diseases and host microbiome / Y. Zhang, C.Y. Lun, S.K. Tsui // Int J Mol Sci. – 2015. – Vol. 16, No. 11. – P. 26263–26279. – DOI 10.3390/ijms161125957.