

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-527>



Сравнительный анализ структуры регуляторных генов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара EI Tor

Плеханов Н.А.[✉], Федоров А.В., Челдышова Н.Б., Кураташвили А.Ю., Заднова С.П.

Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Актуальность. Экспрессия генов *ctxAB* и *tcpA-F*, кодирующих основные факторы патогенности возбудителя холеры, контролируется регуляторными генами, структура которых в штаммах возбудителя, выделенных в разные годы текущей пандемии, изучена не в полной мере.

Цель работы — сравнительный анализ структуры регуляторных генов в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара EI Tor, изолированных на территории России и сопредельных стран на протяжении 7-й пандемии холеры.

Материалы и методы. Использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 29 токсигенных штаммов, выделенных с 1970 по 2023 г. Анализ проводили с помощью программ «BioEdit v7.2.6.1» и «Blast».

Результаты. Проведён анализ 10 регуляторных генов (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *hns*, *hapR*, *vieA*, *luxO*, *luxT*, *carS*, *carR*). Установлено, что практически у всех штаммов в гене *hapR* имеется вставка тимина в позиции 219. Исключение составил *V. cholerae* M3208 (Тамбов, 2023), у которого обнаружена вставка 5 нуклеотидов в данном гене. У 44,8% изученных штаммов выявлены мутации в гене *luxO*, функциональное значение которых не установлено. У 46,7 и 33,3% изученных геновариантов с аллелем *ctxB1* обнаружены несинонимичные замены в генах *hns* (G319A) и *vieA* (C235T) соответственно. Все геноварианты с аллелем *ctxB7* имеют гены *hns* и *vieA* с мутациями. Три геноварианта с аллелем *ctxB7*, завезённые в Россию в последние годы, содержат изменённую структуру гена *carR* (G265A).

Заключение. Структура генов (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *carS*, *luxT*, *hapR*) является интактной у большинства изученных штаммов *V. cholerae* O1 EI Tor. В то же время выявлена вариабельность генов *hns* (G319A), *vieA* (C235T) и *carR* (G256A). Мутации в данных генах могут быть использованы в качестве генетических меток современных геновариантов *V. cholerae* O1 EI Tor.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, структура регуляторных генов, мутации

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Плеханов Н.А., Федоров А.В., Челдышова Н.Б., Кураташвили А.Ю., Заднова С.П. Сравнительный анализ структуры регуляторных генов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара EI Tor. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(4):520–529.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-527>

EDN: <https://www.elibrary.ru/fjzedx>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-527>

Comparative analysis of the structure of regulatory genes of *Vibrio cholerae* serotype O1 biotype EI Tor strains

Nikita A. Plekhanov[✉], Andrey V. Fedorov, Nadezhda B. Cheldyshova, Alina Yu. Kuratashvili, Svetlana P. Zadnova

Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. The expression of the *ctxAB* and *tcpA-F* genes encoding the main pathogenicity factors of the *Vibrio cholerae* is controlled by regulatory genes. The structure of these genes has not been fully studied in the pathogen strains isolated during different periods of the current pandemic.

The aim of the study was a comparative analysis of the structure of regulatory genes of *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains isolated on the territory of the Russian Federation and neighboring countries during the seventh cholera pandemic.

Materials and methods. The nucleotide sequences of the complete genomes of 29 toxigenic strains isolated from 1970 to 2023 were analyzed. The analysis was carried out using BioEdit v7.2.6.1 software and Blast tool.

Results. The analysis of ten regulatory genes (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *hns*, *hapR*, *vieA*, *luxO*, *luxT*, *carS*, *carR*) was carried out. Almost all strains were found to have a thymine insertion in the *hapR* gene at position 219. The exception was *V. cholerae* strain M3208 (Tambov, 2023), which had an insertion of five nucleotides in this gene. Mutations of the *luxO* gene with an unknown effect were detected in 44.8% of the studied strains. In 46.7% and 33.3% of the studied genetic variants carrying the *ctxB1* allele, non-synonymous substitutions were detected in the *hns* (G319A) and *vieA* (C235T) genes, respectively. All genetic variants with the *ctxB7* allele have mutations in both the *hns* and *vieA* genes. Three genetic variants with the *ctxB7* allele, imported to the Russian Federation in recent years, contain an altered structure of the *carR* gene (G265A).

Conclusion. The structure of genes (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *carS*, *luxT*, *hapR*) of *V. cholerae* O1 El Tor strains remains unchanged for the majority of the studied isolates. At the same time, variability in the *hns* (G319A), *vieA* (C235T) and *carR* (G256A) genes was detected. Mutations in these genes can be used as genetic markers of modern *V. cholerae* O1 El Tor genetic variants.

Keywords: *Vibrio cholerae*, genetic variants, regulatory gene structure, mutations

Funding source. The authors declare no external funding for the study.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this manuscript.

For citation: Plekhanov N.A., Fedorov A.V., Cheldyshova N.B., Kuratashvili A.Yu., Zadnova S.P. Comparative analysis of the structure of regulatory genes of *Vibrio cholerae* serotype O1 biotype El Tor strains. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(4):520–529.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-527>

EDN: <https://www.elibrary.ru/fjzedx>

Введение

Холера — особо опасная инфекционная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами *Vibrio cholerae*, остается серьезной проблемой здравоохранения во многих странах Азии, Африки, Америки (регион Карибского бассейна). Ежегодно регистрируется около 2,9 млн случаев холеры, из которых более 95 000 заканчиваются летально. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, с середины 2021 г. отмечается рост заболеваемости и смертности от данной болезни¹. Так, средний показатель летальности в 2021 г. составил 1,9% (в странах Африки — 2,9%), что является самым высоким за последнее десятилетие, и данная тенденция сохранилась в 2022–2023 гг. Остаётся высоким риск завоза возбудителя в любую страну мира [1].

Текущая, 7-я, пандемия холеры является самой длительной (продолжается уже более 60 лет) и включает несколько линий штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor с определённой структурой генов *ctxAB* и *tcpA-F*, кодирующих основные факторы патогенности возбудителя холеры — холерный токсин (ХТ) и токсин-корегулируемые пили адгезии (ТКПА) [3, 4]. Начало пандемии было вызвано типичными штаммами *V. cholerae* O1 биовара El Tor, содержащими аллели *ctxB3* и *tcpA^{eltor}*. В 1990-х гг. появились генетически изменённые варианты *V. cholerae* O1 биовара El Tor (геноварианты), кото-

рые отличались от типичных штаммов повышенной продукцией ХТ в результате замены аллеля *ctxB3* на *ctxB1*, характерного для возбудителя 6-й пандемии — *V. cholerae* O1 классического биовара. Дальнейшие эволюционные преобразования геновариантов способствовали появлению «гипервирулентных» штаммов, которые не только имеют новые аллели *ctxB* — *ctxB7* и *tcpA* — *tcpA^{cirs101}*, но и включают около 70 генов с единичными нуклеотидными заменами, а также делеции в мобильных генетических элементах [2–6]. При этом рядом авторов показано, что повышение вирулентности геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor связано с изменением структуры основных генов патогенности (*ctxB* и *tcpA*), другими — с появлением мутаций в структуре ряда регуляторных генов [6–8]. Как известно, экспрессия генов *ctxAB* и *tcpA-F* контролируется сложным регуляторным каскадом с участием различных положительных и отрицательных факторов транскрипции, а также зависит от плотности бактериальной популяции, сигналов внешней среды (температура, соли желчных кислот, pH среды, осмоляемость и т.д.) и продуцируемых сигнальных молекул (в том числе 3',5'-циклического дигуанинмонофосфата, c-di-GMP). Непосредственным транскрипционным активатором генов *ctxAB* и *tcpA-F* является белок ToxT, продукция которого контролируется белком ToxR, играющим важную роль в вирулентности холерного вибриона. Для активации транскрипции *toxT* белок ToxR взаимодействует с другими белками — ToxS и TcpPH. В свою очередь транскрипция

¹ Cholera – Global situation. WHO Report; 2023. URL: <https://who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437>

генов *tcpPH* зависит от белков AphAB. Показано, что активная экспрессия AphAB происходит при низкой плотности бактериальной популяции. В данных условиях фосфорилированный белок системы «quorum sensing» LuxO ингибирует экспрессию quorum-чувствительного регуляторного белка HarR (оказывающего негативное влияние на каскад вирулентности) — происходит продукция ХТ и ТКПА [9, 10]. Кроме AphA с промотером *tcpP* при нахождении патогена *in vivo* связывается и белок CarR, действующий совместно с CarS, что способствует увеличению колонизирующей способности штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Кроме того, в присутствии катионных антимикробных пептидов (HD-5, α -дефензин, β -дефензин), продуцируемых эпителиальными клетками, CarR непосредственно регулирует экспрессию генов, кодирующих систему модификации липида А липополисахарида клеточной стенки (оперон *almEFG*), что придаёт устойчивость бактерий к катионным пептидам и обеспечивает нормальный рост вибрионов в кишечнике. Таким образом, белок CarR регулирует вирулентность возбудителя и способствует устойчивости патогена в макроорганизме [11].

При увеличении количества бактерий фосфорилирование LuxO не происходит, и он не блокирует *hapR*. Продуцируемый белок HarR подавляет транскрипцию *aphAB* и *tcpPH*. В итоге прекращается биосинтез факторов вирулентности [9, 10]. Кроме LuxO, транскрипцию *hapR* репрессирует и недавно обнаруженный у патогена белок LuxT, который также непосредственно связывается с промоторной областью *hapR* [11]. Негативным регулятором транскрипции генов *ctxAB* и *tcpA-F* является и ДНК-связывающий гистонподобный белок H-NS, который репрессирует транскрипцию *toxT*, а также блокирует транскрипцию генов *ctxAB* и *tcpA*, связываясь с той же областью ДНК, что и белок ToxT [12]. Ещё одним белком, участвующим в регуляции продукции факторов вирулентности, посредством контроля содержания вторичного мессенджера c-di-GMP (cyclic diguanosine monophosphate), является VieA, кодируемый геном *vieA* из оперона *vieSAB*. Транскрипция гена *vieA* в клетках подавляется как белком H-NS, так и HarR. Данный белок содержит ДНК-связывающий участок, а также домен (EAL) с дигуанилат-фосфодиэстеразной активностью, гидролизующий c-di-GMP. Накапливаясь в клетках в высокой концентрации, c-di-GMP ингибирует транскрипцию генов *ctxAB* и *toxT*, и деградация этой молекулы способствует увеличению биосинтеза ХТ и ToxT [13].

Также стоит отметить, что регуляторные гены, контролируемые не только вирулентные, но и другие свойства бактерий (в том числе формирование биоплёнки), выступают в качестве перспективных мишеней для создания антимикробных препаратов

нового поколения. В настоящее время проводятся исследования по поиску и синтезу антимикробных пептидов, способных снижать вирулентность возбудителя холеры и разрушать образование биоплёнок без токсического воздействия на макроорганизм. При этом перспективной мишенью выбран белок LuxO [14].

Таким образом, структура генов *ctxB* и *tcpA* у геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor, завезённых в разные годы на территорию России и сопредельных стран, достаточно подробно изучена [15–18]. В то же время распространённость мутаций в регуляторных генах в данных штаммах исследована фрагментарно. **Цель работы** — сравнительный анализ структуры регуляторных генов в штаммах *V. cholerae* O1 биовара El Tor, изолированных на территории России и сопредельных стран на протяжении 7-й пандемии холеры.

Материалы и методы

В работе использовали полногеномные последовательности 29 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, завезённых с 1970 по 2023 г. на территорию России и сопредельных стран, депонированные в NCBI GenBank и в VGARus (штаммы M3208 и M3210). Характеристика использованных штаммов приведена в **таблице**.

Штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии в Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб». Для культивирования бактерий использовали бульон и агар LB (pH 7,2). Подготовку проб осуществляли согласно МУ 1.3.2569-09². Подготовку образцов ДНК исследуемых штаммов проводили в боксе биологической безопасности II класса в противочумном костюме IV типа с использованием набора «TransGen EasyPure Genomic DNA Kit» в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование ДНК осуществляли на платформе «DNBSEQ-G50» («MGI Tech») с использованием стандартного протокола подготовки ДНК-библиотек, соответствующего платформе.

Анализ структуры регуляторных генов *toxT*, *aphA/aphB*, *hns*, *hapR*, *vieA*, *luxO/luxT*, *carR/carS* проводили с помощью программы «BioEdit v7.2.6.1» и алгоритма «BLAST v2.15.0 NCBI GenBank».

Результаты

На первом этапе работы была изучена структура гена *toxT*, кодирующего регуляторный белок ToxT. Согласно данным литературы, указанный бе-

² 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. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2009.

Характеристика и результаты анализа структуры регуляторных генов штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара E1 Tor, использованных в работе
 Characteristics and results of analysis of the structure of regulatory genes of *V. cholerae* O1 strains of the E1 Tor biovar serogroup used in the study

Штамм Strains	Год, место и источник выделения The year, site and source of isolation	Структура гена (замена аминокислот) Gene structure (amino acid substitutions)						
		<i>toxT</i> VC0838	<i>aphA/aphB</i> VC2647/VC1049	<i>hns</i> VC1130	<i>hapR</i> VC0583	<i>viaA</i> VC1652	<i>luxO/luxT</i> VC1021/VCA0917 <i>carR/carS</i> VC1320/ VC1319	
Типичные штаммы <i>V. cholerae</i> O1 E1 Tor с аллелем <i>ctxB3</i> Typical <i>V. cholerae</i> O1 E1 Tor strains with the <i>ctxB3</i> allele								
M1062 (SSAB01)	1970, РФ, Астрахань, больной RF, Astrakhan, patient	int	int/int	int	insT219, C118G (H40D)	int	int/int	int/int
M893 (SSAA01)	1970, РФ, Астрахань, больной RF, Astrakhan, patient	int	int/int	int	insT219	int	int/int	int/int
M818 (LANM01)	1970, РФ, Балаково, больной RF, Balakovo, patient	int	int/int	int	insT219	int	int/int	int/int
M1030 (NEDX01)	1972, Туркменистан, Йолотен, больной Turkmenistan, loloten, patient	int	int/int	int	insT219	int	A521G (H174R)/int	int/int
C-191 (WNZT01)	1973, РФ, Ставрополь, больной RF, Stavropol', patient	int	int/int	int	insT219, C109T (R37C)	insTTC p:365	int/int	int/int
123AZ (SMZB01)	1977, Азербайджан, больной Azerbaijan, patient	int	int/int	int	Δ	int	int/int	int/int
2278 (WNZM01)	1987, РФ, Краснодар, больной RF, Krasnodar, patient	int	int/int	int	insT219, G76A (A26T)	int	A340G (K114E)/int	int/int
Геноварианты <i>V. cholerae</i> O1 E1 Tor с аллелем <i>ctxB1</i> Genetic variants of <i>V. cholerae</i> O1 E1 Tor with the <i>ctxB1</i> allele								
P13762 (LQYD01)	1988, Узбекистан, Ташкент, больной Uzbekistan, Tashkent, patient	int	int/int	int	insT219	int	int/int	int/int
M1270 (VXCC01)	1993, РФ, Татарстан, Набережные Челны, больной RF, Tatarstan, Naberezhnye Chelny, patient	int	int/int	int	insT219	int	T98C (I33T)/int	int/int
M1275 (LRAF01)	1993, РФ, Дагестан, Каспийск, больной RF, Dagestan, Kaspiysk, patient	int	int/int	int	int	int	int/int	int/int
M1293 (JFFW01)	1994, РФ, Дагестан, больной RF, Dagestan, patient	int	int/int	int	insT219	int	T176A (L59H)/int	int/int
20-A-11 (PYAR01)	1995, Украина, больной Ukraine, patient	int	int/int	int	insT219	int	int/int	int/int
R17644 (JRTW01)	1997, РФ, Ачинск, больной RF, Achinsk, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	int	T62A (I21N)/int	int/int
M1327 (LRFE01)	1998, РФ, Дагестан, больной RF, Dagestan, patient	int	int/int	int	insT219	int	int/int	int/int

Окончание таблицы | End of the Table

Штамм Strains	Год, место и источник выделения The year, site and source of isolation	Структура гена (замена аминокислот) Gene structure (amino acid substitutions)						
		<i>toxT</i> VC0838	<i>aphA/aphB</i> VC2647/VC1049	<i>hns</i> VC1130	<i>hapR</i> VC0583	<i>viaA</i> VC1652	<i>luxO/luxT</i> VC1021/VCA0917	<i>carR/carS</i> VC1320/ VC1319
M1344 (NEDY01)	2001, РФ, Татарстан, Казань, больной RF, Tatarstan, Kazan, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	int	int/int	int/int
M1429 (LAEM01)	2004, РФ, Башкортостан, Белорецк, больной RF, Bashkortostan, Beloretsk patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	int/int	int/int
RND18826 (AYOM01)	2005, РФ, Тверь, больной RF, Tver, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	G424T (V142L)/int	int/int
P-18899 (LAKM01)	2006, РФ, Мурманск, больной RF, Murmansk, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	C527T (A176V)/int	int/int
89 (NDXR01)	2010, Украина, Ялта, вн. ср. Ukraine, Yalta, env.	int	int/int	int	insT219	int	T287G (I96S)/Δ	int/int
2011EL-301 (AJFN01)	2011, РФ, Таганрог, вн. ср. RF, Taganrog, env.	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	G424T (V142L)/int	int/int
81 (JRCM01)	2014, РФ, Ростов-на-Дону, вн. ср. RF, Rostov-on-Don, env.	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	G424T (V142L)/int	int/int
M3210 (<i>micro26579</i>)	2023, РФ, Ростов-на-Дону, вн. ср. RF, Rostov-on-Don, env.	G436A (V146I)	int/int	int	insT219	int	G331A (A111T)/int	int/int
Геноварианты <i>V. cholerae</i> O1 El Tor с аллелем <i>ctxB7</i> Genetic variants of <i>V. cholerae</i> O1 El Tor with the <i>ctxB7</i> allele								
L3226 (JDVX01)	2010, РФ, Москва, больной RF, Moscow, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	T287G (I96S)/int	int/int
RND19191 (JNGT01)	2010, РФ, Москва, больной RF, Moscow, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	int/int	int/int
76 (MPVL01)	2011, Украина, Мариуполь, больной Ukraine, Mariupol, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	int/int	int/int
153 (MWRE01)	2011, Украина, Мариуполь, больной Ukraine, Mariupol, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	G268T (G90C)/int	int/int
M1509 (NEDZ01)	2012, РФ, Москва, больной RF, Moscow, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	int/int	G256A (D89N)/int
3265/80 (JRQL01)	2014, РФ, Москва, больной RF, Moscow, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insT219	C235T (L79F)	int/int	G256A (D89N)/int
M3208 (<i>micro26578</i>)	2023, РФ, Тамбов, больной RF, Tambov, patient	int	int/int	G319A (G107S)	insCTAAA97 (33fs)	C235T (L79F)	int/int	G256A (D89N)/int

Примечание. В столбце «Штамм» в скобках указан сокращённый код доступа в GenBank, курсивом выделен код доступа в VGARus; вн. ср. — внешняя среда; ins — вставка нуклеотида(ов); int — структура гена идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 биовара El Tor; fs — сдвиг рамки считывания; Δ — делеция гена.

Note. The GenBank accession number is indicated in parentheses in the Strains column, the VGARus accession number is indicated in italics; env. — environmental; ins — nucleotide insertion; int — the structure is identical to the reference strain *V. cholerae* N16961 O1 El Tor; fs — frameshift mutation; Δ — gene deletion.

лок включает 276 аминокислот. Наиболее важным участком является N-терминальный домен (1–164 аминокислоты). Показано, что стабильное сохранение структуры N-терминального участка необходимо для транскрипционной активности данного регулятора [19]. В результате проведённого нами анализа установлено, что структура данного гена у большинства взятых в исследование штаммов соответствует референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 биовара El Tor. Исключение составил штамм M3210 (Ростов-на-Дону, 2023) у которого обнаружена несинонимичная однонуклеотидная замена G436A, которая привела к смене аминокислоты валина на изолейцин в позиции 146 в N-терминальном домене белка ToxT.

Изменений в нуклеотидной последовательности генов *aphA* и *aphB* у взятых в исследование штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor не выявлено.

При изучении структуры гена *luxO* показано, что у большинства типичных штаммов структура данного гена соответствовала референсному штамму. Исключение составили штаммы *V. cholerae* M1030 и 2278, имеющие несинонимичные замены, что привело к смене аминокислот в центральном и аминотерминальном участках белка LuxO. Среди геновариантов 11 штаммов имели несинонимичные SNP (таблица). Сведения о влиянии указанных аминокислотных замен на функциональную активность белка LuxO в литературе отсутствуют. Однако практически все изученные штаммы *V. cholerae* O1 биовара El Tor имели интактную последовательность гена *luxT*. Белок LuxT, как и LuxO, ингибирует транскрипцию *hapR*. Исключение составил штамм *V. cholerae* 89 (Ялта, 2010), у которого ген *luxT* не обнаружен.

Далее нами была изучена структура гена *hapR*, кодирующего белок HapR. Согласно данным литературы, в штамме *V. cholerae* N16961 O1 El Tor, который используется в качестве референсного, в последовательности гена *hapR* имеется делеция тимины в позиции 219, что приводит к сдвигу рамки считывания и синтезу функционально неактивного белка HapR [20]. У большинства изученных нами штаммов присутствует ген *hapR* со вставкой тимины, что указывает на продукцию ими полноценного белка HapR. Исключение составили типичные штаммы *V. cholerae* 123AZ, у которого данный ген отсутствует, а также M1062, C-191 и 2278 с заменами аминокислот в начале N-концевого участка, не влияющими на формирование зрелого белка HapR и его функцию [21]. У геноварианта *V. cholerae* M3208 (Тамбов, 2023) в результате инсерции 5 нуклеотидов в начале гена происходит сдвиг рамки считывания. Данный штамм синтезирует белок HapR с изменённым аминокислотным составом и, вполне вероятно, с изменённой функциональной активностью.

При изучении нуклеотидной последовательности гена *hns*, кодирующего белок-репрессор H-NS, выявлено, что у типичных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, а также у геновариантов, завезённых в 1988–1995 гг., нуклеотидная последовательность данного гена соответствует последовательности аналогичного гена референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. Изменённая структура гена *hns* (замена G на A в позиции 319) выявлена у геноварианта R17644 (Ачинск, 1997), имеющего аллель *ctxB1*. Мутация G319A привела к смене аминокислоты (G107S) в ДНК-связывающем участке белка H-NS (таблица). В последующие годы геноварианты с аллелем *ctxB1* включали как интактный, так мутантный ген *hns*. В то же время мутация G319A в гене *hns* присутствует у всех геновариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, имеющих аллель *ctxB7*.

Анализ гена *vieA* из оперона *vieSAB* показал наличие интактной его последовательности у 5 типичных штаммов. Исключение составил штамм *V. cholerae* C191, у которого обнаружена вставка 3 нуклеотидов, кодирующих лизин, в результате чего синтезируется белок VieA с изменённой аминокислотной последовательностью. Геноварианты *V. cholerae* O1 El Tor с *ctxB1*, завезённые с 1988 по 2001 гг., имеют интактный ген *vieA*. В то же время у *V. cholerae* M1429 (Белорецк, 2004) уже присутствует SNP (C235T), приводящая к замене аминокислоты (L79F). В последующие годы белок VieA с данной аминокислотной последовательностью выявлен у большинства изученных геновариантов с аллелем *ctxB1*, а также у всех штаммов с аллелем *ctxB7*. Ранее подобные изменения в структуре белка VieA были выявлены K.J.F. Satchell с соавт. у геновариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в Зимбабве (2009), Бангладеш (2010), на острове Гаити (2010) [6].

Нуклеотидная последовательность гена *carS* является интактной у всех изученных штаммов, в то же время в гене *carR* выявлены изменения (таблица). В ранее проведённой работе нами обнаружены 2 геноварианта (M1509, 3265/80), в гене *carR* которых присутствует замена G256A, приводящая к смене аминокислот D89N [22]. В результате данной мутации синтезируется нефункциональный белок CarR и изменяется диагностически значимый признак El Tor вибрионов — устойчивость к полимиксину В, штаммы становятся чувствительными к указанному катионному антибиотику [23]. В данной работе выявлен ещё один штамм — *V. cholerae* M3208 (Тамбов, 2023), который также содержит мутацию G256A в гене *carR* (таблица).

Обсуждение

Производство основных факторов патогенности — ХТ и ТКПА в штаммах *V. cholerae* O1 серо-

группы биовара El Tor контролируется значительным количеством регуляторных белков, образующих регуляторную сеть. При этом некоторые из них являются полифункциональными и участвуют в других процессах бактериальной клетки. В данной работе нами был проведён анализ 10 регуляторных генов и выявлены важные изменения, характерные для современных штаммов возбудителя.

При анализе нуклеотидной последовательности гена *toxT* установлена её идентичность данному гену референс-штамма *V. cholerae* N16961 практически у всех изученных как типичных штаммов, так и геновариантов с разными аллелями *ctxB*. Исключение составил геновариант *V. cholerae* M3210 (Ростов-на-Дону, 2023), у которого присутствие несинонимичной SNP в гене *toxT* привело к продукции мутантного белка ToxT с заменой валина на изолейцин в позиции 146. В ранее проведённой работе показано, что при замене валина на аргинин (*V146A*) мутантный штамм сохранял высокий уровень продукции ХТ и ТКПА, сопоставимый с исходным, при выращивании его в разных средах (LB, АК1) при температуре 30°C. В то же время культивирование мутантного штамма при температуре 37°C приводило к значительному снижению биосинтеза ХТ (9% от исходного) и полному отсутствию продукции ТКПА [19]. Можно высказать предположение, что у штамма *V. cholerae* M3210 биосинтез ХТ и ТКПА также будет зависеть от температуры культивирования. Однако для проверки данного предположения необходимы дополнительные исследования.

Стабильное сохранение структуры генов *aphA* и *aphB* у штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, завезённых и выделенных на территории России и сопредельных стран в разные периоды текущей пандемии холеры, может указывать на их важную роль в биологии возбудителя холеры. Так, белок AphA участвует не только в контроле продукции ХТ и ТКПА, но и в биосинтезе ацетоина, который противодействует закислению среды при росте холерного вибриона в присутствии глюкозы, а также контролирует процесс формирования биоплёнки [24, 25]. Достаточно стабильной является и структура гена *hapR* — выявлен только 1 штамм (*V. cholerae* M3208), завезённый из Индии в 2023 г., который содержит вставку 5 нуклеотидов в данном гене, что приводит к сдвигу рамки считывания и, возможно, биосинтезу нефункционального белка HapR. В ранее проведённой работе показано, что наличие функционального белка HapR не является существенным для проявления патогенных свойств *V. cholerae*. Штаммы с делетированным геном *hapR* были вирулентными [26].

При изучении другого негативного регулятора — белка H-NS установлено, что 46,7% изученных геновариантов с аллелем *ctxB1*, а также все

штаммы с аллелем *ctxB7* имеют несинонимичную SNP (*G319A*) в гене *hns*, что привело к замене аминокислот в позиции 107 (*G107S*). В.М. Carignan и соавт. показали, что в штаммах с данной мутацией белок H-NS теряет способность связываться с ДНК и репрессировать транскрипцию гена *toxT*, что приводит к увеличению продукции белка ToxT, и вследствие этого возрастает биосинтез ХТ и ТКПА и повышаются вирулентные свойства штаммов [8]. Стоит отметить, что мутация в гене *hns* возникла уже вскоре после появления первых геновариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, т. к. уже в 1997 г. на территорию России были завезены штаммы с мутацией *G319A*. Для геновариантов с аллелем *ctxB7* указанная структура гена *hns* является уже характерным признаком (генетической меткой).

При анализе структуры гена *vieA* установлено, что штаммы с мутированным *vieA* (*C235T*) впервые были завезены в Россию в 2004 г. (таблица). Белок VieA играет важную роль в биологии штаммов классического биовара, т. к. регулирует транскрипцию 401 гена (10,3% генома). В то же время у El Tor вибрионов под контролем VieA находятся всего несколько генов, в том числе *yps* и *rbm*, кодирующие, соответственно, продукцию экзополисахарида и белковый матрикс биоплёнки [27]. Однако изменения в структуре гена *vieA* важны для El Tor вибрионов в совокупности с вариабельностью гена *hns*. Мутация *G319A* в гене *hns* приводит к повышению экспрессии штаммами ХТ, ТКПА, а также гемолизина HlyA и MARTX токсина, но при нахождении в кишечнике данные гипервирулентные штаммы становятся чувствительными к действию антимикробных пептидов и желчи хозяина. В то же время при изменении структуры гена *vieA* и продукции мутантного белка VieA данные штаммы *in vivo* приобретают устойчивость к действию указанных стрессоров [28]. В экспериментально полученных штаммах, содержащих нуклеотидную последовательность *hapR* с инсерцией тимина в позиции 219, наряду с наличием изменённой структуры *hns* (*G319A*) и/или *vieA* (*C235T*), биосинтез ХТ значительно возрастал [8]. Среди изученных нами ряд геновариантов с аллелем *ctxB1*, а также все штаммы с аллелем *ctxB7* включают указанные гены (*hns* и *vieA*) с мутациями, что указывает на участие данных изменённых регуляторов в повышении продукции ХТ в данных штаммах.

Появление мутации *G265A* в гене *carR* у геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных в последние годы, согласно данным литературы, приводит к снижению транскрипционной активности белка CarR, что выражается в уменьшении экспрессии *almEFG* оперона и снижению процесса модификации липополисахарида клеточной стенки. В результате данного процесса клетки становятся чувствительными к действию катионного антими-

кробного препарата — антибиотик полимиксину В, что фенотипически *in vitro* проявляется изменением диагностически значимого признака и отсутствию роста штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor в его присутствии [23]. Однако, возможно, при нахождении *in vivo*, в условиях воздействия катионных антимикробных пептидов хозяина, геноварианты, синтезирующие мутантный белок CarR, будут устойчивыми к их действию, т. к. они продуцируют мутантный белок VieA, который восстанавливает устойчивость патогена к действию данных стрессоров [28].

При анализе структуры гена *luxO* установлена его вариабельность как у типичных штаммов, так и у геновариантов. В изученной нами литературе отсутствуют сведения о влиянии выявленных мутаций на функциональную активность LuxO. Можно предположить, что наличие функционального LuxT практически у всех штаммов, как и LuxO, выполняющего ингибирующую функцию в отношении *hapR*, может компенсировать снижение или отсутствие активности LuxO. В ранее проведённой работе установлено, что у «гипервирулентного» геноварианта *V. cholerae* MQ1795 O1 биовара El Tor (Бангладеш, 1994), наряду с мутациями в *hapR* (вставка T в позиции 219), *hns* (G319A), *vieA* (C235T), изменена и структура гена *luxO* (C656T) [8]. Однако у изученных нами штаммов данная мутация не выявлена.

Заключение

Проведённое исследование показало, что нуклеотидная последовательность ряда изученных регуляторных генов (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *carS*, *luxT*, *hapR*) у штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, завезённых и выделенных на территории России и сопредельных стран, остаётся неизменной. В то же время структура других генов изменяется. Наиболее значимыми являются мутации в гене *carR*, что привело к изменению диагностически значимого признака и появлению чувствительных к антибиотик полимиксину В геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor, а также в генах *hns* и *vieA*, кодирующих негативные регуляторы продукции факторов патогенности. Можно высказать предположение, что постепенное повышение вирулентности геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor явилось результатом изменения регуляторных механизмов продукции основных факторов патогенности — ХТ и ТКПА вследствие появления мутаций как в структурных генах *ctxB* и *tcpA*, так и в регуляторных *hns* и *vieA*, кодирующих белки-репрессоры. При этом мутации, выявленные в генах *hns* (G319A), *vieA* (C235T) и *carR* (G256A) у всех изученных штаммов с аллелем *ctxB7*, могут быть использованы в качестве генетических меток современных геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):56–66. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., et al. Cholera: analysis and assessment of epidemiological situation around the world and in Russia (2013–2022). Forecast for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(1):56–66. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-56-66> EDN: <https://elibrary.ru/hzasbo>
2. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011;477(7365):462–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10392>
3. Weill F., Domman D., Njamkepo E., et al. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science*. 2017; 358(6364):785–9. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad5901>
4. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(9):3296–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
5. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(11):3739–49. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
6. Satchell K.J., Jones C.J., Wong J., et al. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016;84(9):2473–81. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00189-16>
7. Naha A., Mandal R.S., Samanta P., et al. Deciphering the possible role of *ctxB7* allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14(4):e0008128. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008128>
8. Carignan B.M., Brumfield K.D., Son M.S. Single nucleotide polymorphisms in regulator-encoding genes have an additive effect on virulence gene expression in a *Vibrio cholerae* clinical isolate. *mSphere*. 2016;1(5):e00253-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00253-16>
9. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007;75(12):5542–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01094-07>
10. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio Cholerae*. *Genomics and Molecular Biology*. Norfolk;2008.
11. Li Y., Yan J., Li J., et al. A novel quorum sensing regulator LuxT contributes to the virulence of *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2023;14(1):2274640. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2274640>
12. Wang H., Ayala J.C., Benitez J.A., Silva A.J. RNA-seq analysis identifies new genes regulated by the histone-like nucleoid structuring protein (H-NS) affecting *Vibrio cholerae* virulence, stress response and chemotaxis. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118295. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118295>
13. Tischler A.D., Camilli A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2005;73(9):5873–82. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5873-5882.2005>
14. Murugesan J., Mubarak S.J., Vedagiri H. Design of novel anti-quorum sensing peptides targeting LuxO to combat *Vibrio cholerae* pathogenesis. *In Silico Pharmacol.* 2023;11(1):30. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40203-023-00172-22023>
15. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я. и др. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных

- штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2012;(2):13–20. EDN: <https://elibrary.ru/pfhmmn>
- Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Y., et al. Molecular-genetic analysis of *Vibrio cholerae* El Tor strains of epidemic risk isolated in Siberian and Far East regions of Russia. *Molecular Genetics, Microbiology, Virology*. 2012;27(2):61–8. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416812020073> EDN: <https://elibrary.ru/rgeqkb>
16. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А. и др. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика*. 2013;49(9):1036–47. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0016675813090087> EDN: <https://elibrary.ru/qzdfjv>
- Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., et al. Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements in natural strains of cholera agent. *Russian Journal of Genetics*. 2013;49(9):898–908. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795413090081> EDN: <https://elibrary.ru/rfqppp>
17. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A. и др. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):17–26. Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., et al. Endemic cholera in India and imported cholera in Russia: what is common? *Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):17–26. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26> EDN: <https://elibrary.ru/sapflg>
18. Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Савельева И.В. и др. Эволюция фенотипических свойств и молекулярно-генетической организации геномов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе с 1970 по 1998 год. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНССО*. 2020;(12):56–61. Savelyev V.N., Kovalev D.A., Savelyeva I.V., et al. The evolution of phenotypic properties and molecular genetic organization of genomes of *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strains isolated from patients and environmental objects in the Caucasus in 1970–1998. *Public Health and Life Environment*. 2020;(12):56–61. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61> EDN: <https://elibrary.ru/cfdbug>
19. Childers B.M., Weber G.G., Prouty M.G., et al. Identification of residues critical for the function of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT by scanning alanine mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 2007;367(5):1413–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.061>
20. Kovacikova G., Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the AphA promoter. *Mol. Microbiol.* 2002;46(4):1135–47. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03229.x>
21. De Silva R., Kovacikova G., Lin W., et al. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *Infect. Immun.* 2007;189(15):5683–91. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01807-06>
22. Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А. и др. Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы Эль Тор биовара и их филогенетический анализ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):538–47. Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Plekhanov N.A., et al. Identification of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B and their molecular genetic analysis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(5):538–47. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-138> EDN: <https://elibrary.ru/evrqpq>
23. Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., et al. A point mutation in carR is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020;88(5):e00080–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
24. Kovacikova G., Lin W., Skorupski K. Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2005;57(2):420–33. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04700.x>
25. Yang M., Frey E.M., Liu Z., et al. The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating the expression of the biofilm regulator VpsT. *Infect. Immun.* 2010;78(2):697–703. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00429-09>
26. Joelsson A., Liu Z., Zhu J. Genetic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2006;74(2):1141–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1141-1147.2006>
27. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Differences in gene expression between the classical and El Tor Biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* 2006;74(6):3633–42. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01750-05>
28. Russell R., Wang H., Benitez J.A., Silva A.J. Deletion of gene encoding the nucleoid-associated protein H-NS unmasks hidden regulatory connections in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology (Reading)*. 2018;164(7):998–1003. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000672>

Информация об авторах

Плеханов Никита Александрович[✉] — к. б. н., с. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, muscari.sp@icloud.com, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Федоров Андрей Витальевич — м. н. с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Челдышова Надежда Борисовна — к. м. н., с. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>

Кураташвили Алина Юрьевна — м. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>

Information about the authors

Nikita A. Plekhanov[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, muscari.sp@icloud.com, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Andrey V. Fedorov — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Nadezhda B. Cheldyshova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>

Alina Yu. Kuratashvili — junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>

Заднова Светлана Петровна — д. б. н., в. н. с., зав. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Участие авторов: *Плеханов Н.А.* — существенный вклад в проведение исследования, анализ полученных данных, редактирование текста статьи; *Федоров А.В.* — проведение исследования, интерпретация полученных данных; *Челдышова Н.Б.* — проведение исследования, анализ полученных данных; *Кураташвили А.Ю.* — проведение исследования; *Заднова С.П.* — формирование идеи, разработка концепции и дизайна исследования, утверждение окончательного варианта статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 12.04.2024;
принята к публикации 13.06.2024;
опубликована 29.08.2024

Svetlana P. Zadnova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Author contribution: *Plekhanov N.A.* — significant contribution to the research, analysis of the data obtained, editing the text of the article; *Fedorov A.V.* — conducting research, interpreting the data obtained; *Cheldyshova N.B.* — conducting research, analyzing the data obtained; *Kuratashvili A.Yu.* — conducting research; *Zadnova S.P.* — idea formation, development of the concept and design of the study, approval of the final version of the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 12.04.2024;
accepted for publication 13.06.2024;
published 29.08.2024