

УДК 577.29

Платформы для поиска новых антимикробных препаратов с использованием *in vivo* моделей *Caenorhabditis elegans*

А. И. Калганова¹, И. Е. Елисеев¹, И. В. Смирнов^{1,2,3*}, С. С. Терехов¹¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, 119991 Россия³Федеральное государственное бюджетное учреждение «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, 117292 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023

Принята к печати 19.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27348

РЕФЕРАТ Несмотря на развитие высокопроизводительных технологий скрининга, существует немного эффективных платформ для скрининга новых антимикробных препаратов. Антимикробную активность соединений преимущественно оценивают на культурах патогенов *in vitro*, что затрудняет или делает невозможным более глубокое изучение молекулярных механизмов взаимодействий между хозяином и патогеном. Тестирование перспективных соединений на *in vivo* моделях с использованием хордовых является весьма трудоемким и затратным, поэтому оно используется в доклинических исследованиях уже отобранных кандидатов, но не для первичного скрининга. Такой подход не способствует отбору молекул с низкой органной токсичностью и не позволяет идентифицировать терапевтические молекулы, воздействующие на факторы вирулентности. Использование микроскопических нематод *Caenorhabditis elegans* для моделирования человеческих инфекций позволяет исследовать взаимодействие хозяин–патоген и идентифицировать антиинфекционные молекулы с новыми механизмами действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Caenorhabditis elegans*, микрофлюидика, модель инфекции, возбудители, открытие лекарств, противомикробные препараты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; QS – чувство кворума (Quorum Sensing).

ВВЕДЕНИЕ

Кризис антибиотикорезистентности связан с проблемой поиска и разработки новых антибиотиков. Первые антибиотики были открыты с использованием принципа скрининга небольших библиотек химических соединений *in vivo* на животных – инфицированных мышках и кроликах [1]. От этого подхода вскоре отказались в пользу более производительного, этичного и удобного тестирования антибиотиков на культурах патогенов *in vitro* [2]. Почти через столетие после открытия первых классов антибиотиков распространение резистентности и острая нехватка новых антибиотиков вынудили искать новые высокопроизводительные платформы и вернуться к скринингу *in vivo* [3].

В настоящее время существует ряд эффективных платформ для скрининга антибактериальных препаратов, активных в отношении полирезистентных патогенов, биопленок и внутриклеточных патогенов [3]. Однако резистентность микроорганизмов возникает быстрее, чем внедрение современных подходов к поиску и тестированию новых терапевтических молекул. Антимикробную активность преимущественно оценивают в культурах возбудителей *in vitro*, что не позволяет детально изучать молекулярные механизмы, опосредующие взаимодействие хозяин–патоген.

Новой стратегией является поиск молекул с альтернативными механизмами действия, например, блокирующих вирулентность, стимулирующих им-

мунный ответ или являющихся пролекарствами. Такие соединения, названные «антиинфекционными» в противоположность антибактериальным, невозможно идентифицировать в обычных экспериментах на культурах патогенов *in vitro*. Для их поиска в настоящее время инфекции моделируют на целых организмах: нематодах *Caenorhabditis elegans*, плодовых мушках *Drosophila melanogaster* и рыбах *Danio rerio* [4]. Задача состоит в том, чтобы путем скрининга больших библиотек соединений идентифицировать как вещества, ингибирующие активность регуляторов продукции факторов вирулентности определенных возбудителей, так и вещества, активирующие врожденный иммунитет [5].

Скрининг на уровне организма имеет ряд преимуществ, главное из которых – одновременное получение данных об активности и токсичности, что делает переход к другим моделям более линейным. Также расставить приоритеты при отборе потенциальных кандидатов помогают нецелевые эффекты, полная абсорбция, физиологичное распределение, общий метаболизм и учет ранней токсичности *in vivo* [6]. Решением стало использование мелких животных, которые имеют простую биологическую систему, позволяющую реализовывать естественные механизмы заражения в лабораторных условиях. Модельный организм нематода *C. elegans* подходит для высокопроизводительного скрининга благодаря небольшому размеру тела, короткому жизненному циклу и простоте в поддержании культуры.

C. elegans является популярной моделью для генетических и физиологических исследований (рис. 1), однако в последнее время этот организм приобретает все большую значимость в качестве модели для изучения механизмов взаимодействий хозяин–патоген на системном уровне [3, 4].

Впервые микроскопические нематоды *C. elegans* использовали для скрининга антибиотиков в модели инфекции в 2006 году [7]. В первом же исследовании нашли несколько соединений, блокирующих развитие инфекции, но при этом не убивающих патогенные бактерии. Это свидетельствует о способности такой *in vivo* модели выявлять молекулы с альтернативными механизмами действия. Вскоре показали, что *C. elegans* хорошо подходит для моделирования многих инфекций человека как бактериальных, так и грибковых [8], а также может использоваться для изучения внутриклеточных инфекций [9] и биопленок [10].

Опубликованы результаты скрининга и идентификации антимикробных соединений с использованием *C. elegans* [11, 12]. Несколько научных групп, развивающих *in vivo* модели инфекций и технологии скрининга химических библиотек в *C. elegans*,

идентифицировали при помощи этой системы ряд перспективных антимикробных молекул. В частности, обнаружено низкомолекулярное соединение, обеспечивающее защиту нематоды от инфекции *Pseudomonas aeruginosa* за счет активации врожденного иммунитета [13]. В модели инфекции резистентного *Staphylococcus aureus* был открыт новый класс ретиноидных антибиотиков (CD437 и аналоги), эффективных в том числе против бактериальных клеток–персистеров [14].

Нематода *C. elegans* является простой моделью-хозяином для изучения взаимоотношений между врожденной иммунной системой животных и различными патогенами [15]. Для *C. elegans* доступны обширные генетические и молекулярные инструменты, облегчающие углубленный анализ компонентов систем защиты хозяина, общих с млекопитающими, и факторов вирулентности возбудителей.

Изучение ответа *C. elegans* на бактериальные инфекции показало, что иммунная система этого организма использует эволюционно консервативные сигнальные пути и синтезирует ряд эффекторных молекул, часть из которых также консервативна (например, сигнальный путь p38 MAPK) [16]. Несмотря на демонстрацию иммунных ответов на инфекцию, точные паттерн-распознающие рецепторы у *C. elegans* до сих пор не обнаружены.

C. elegans – первый многоклеточный организм, геном которого полностью секвенирован. С помощью биоинформатических подходов выявлена высокая степень сходства (60–80%) многих генов нематоды с генами человека [17], что делает *C. elegans* ценным модельным тест-объектом для изучения токсичности [6]. В результате нематода *C. elegans* стала инструментальной моделью для понимания механизмов молекулярного патогенеза многих заболеваний человека. Врожденный иммунитет *C. elegans* стал предметом для изучения иммунной защиты и роли клеточного стресса в реакции организма на инфекцию, в том числе моделирования активации генов в ответ на инфекцию [18].

МОДЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В *C. elegans*

C. elegans можно заразить выбранным патогеном, просто заменив им обычный источник пищи, которым в лабораторных условиях может быть, например, штамм *Escherichia coli* OP50, условно непатогенный для этой нематоды. Бактериальное окружение является естественным для нематод [19]. Использование убитых нагреванием бактерий *E. coli* не дает никаких преимуществ перед использованием живых бактерий, так как термодеструкция делает такое питание непривлекательным для нематод, а также не содержит всех питательных ве-

Таблица 1. Основные протоколы заражения нематод

Протокол	Основные характеристики
Slow killing «Медленное уничтожение»	Механизм уничтожения, основанный на инфекционно-подобном процессе, включает установление и пролиферацию возбудителя в кишечнике с образованием биопленок, изучение торможения бактериального патогенеза
Fast killing «Быстрое уничтожение»	Главную роль играет феназин-1-карбоновая кислота, которая в кислой среде крайне токсична для клеток
Liquid killing «Жидкостный протокол»	Создаются условия гипоксии из-за выделяемых эндотоксинов

ненный цикл нематоды (затрудненная дефекация, долгое удерживание яиц, а вследствие этого формирование фенотипа bag of worms – «мешок с червями»). Например, при инфицировании *P. aeruginosa* наблюдается секреция пиовердина, необходимого для пополнения внутриклеточных запасов железа бактерии. Этот сидерофор поглощается *C. elegans* вместе с другими веществами в жидкой среде [29, 30]. Попав в организм хозяина, пиовердин получает доступ к трехвалентному железу и удаляет его [31, 32], что приводит к быстрой клеточной смерти нематоды. Большинство протоколов фиксируют общую токсическую нагрузку, при этом уровень бактериальной нагрузки в пищеварительном тракте нематоды часто не анализируется.

Анализ выживаемости *C. elegans*

Для оценки воздействия патогена или тестируемого вещества используется множество признаков и характеристик нематоды: продолжительность жизни, изгиб тела и его длина, активность глоточного насоса, количество бактерий внутри организма, накопление жировой ткани, изменение целостности вульвы, количество потомков. Проводят также стресс-анализы: анализируют действие теплового, акустического, окислительного стресса, изменения экспрессии генов хозяина и флуоресценции, как результата запуска определенного сигнального пути, измеряют накопление определенных белков [33, 34]. Оценка «средней выживаемости» червей, подвергшихся воздействию определенного бактериального изолята, соответствует показателю бактериальной вирулентности [35]. В ходе таких экспериментов определяют 50% летальное время (LT50) [34].

Продолжительность жизни можно определять как в твердых, так и в жидких средах. Типичный протокол включает подсчет живых и мертвых червей из первоначальной синхронизированной популяции за определенный период времени [6]. Живых и мертвых червей регистрируют по реакции на прикосновение платиновой проволокой, встряхивание или воздействие света, или по сигналу флуоресценции витального красителя (в случае жидких сред).

При недостатке питательных веществ бактерии могут выделять в среду токсичные метаболиты и непосредственно эндотоксины. Анализ выживаемости в данном случае будет иметь многофакторный характер.

В первой работе по использованию *C. elegans* для моделирования инфекций было показано, что рассеянные в лунки планшета с культуральной средой нематоды сохраняют жизнеспособность на протяжении как минимум 14 дней [7]. Что же позволяет нематодам сохранять жизнеспособность? По-видимому, этот эффект достигается за счет одновременного переноса с нематодами бактерий, которыми они питаются, а также достаточного количества питательной среды для поддержания популяции бактерий.

Работа с *C. elegans* начиналась с детального генетического типирования, что позднее, в совокупности с относительной простотой и удобством экспериментальной работы с этой нематодой, привело к тому, что этот объект стал модельным [35]. Изучение взаимодействия хозяина с микроорганизмами на модели *C. elegans* может в конечном итоге дать информацию о том, как микробы влияют на функцию нервной системы у более сложных животных [36], так как неоднократно было продемонстрировано весьма значительное сходство данных, полученных на мышах и нематодах [37, 38].

Результаты, полученные к настоящему времени, указывают на важность накопления большого массива однородных данных. Существует методология массового одновременного наблюдения нематод, которая может помочь в проведении сложных генетических и поведенческих исследований, увеличивая количество фенотипов, которые обнаруживают в настоящее время, используя большие количества наблюдаемых одновременно организмов [39]. Однако данный подход, повышая достоверность результатов, не интенсифицирует процесс тестирования.

Социальное поведение

У нематод, питающихся бактериями на агаре, часто возникает совместное питание, что тоже влияет

на количество и скорость потребляемой бактериальной пищи [21]. Изоляты *C. elegans* дикого типа при выращивании в лаборатории объединяются и питаются группами, в то время как лабораторный штамм N2 питается индивидуально. Наиболее часто встречаемая гипотеза, объясняющая, почему дикие изоляты агрегируют, заключается в том, что агрегация позволяет избежать среды с высоким содержанием кислорода. Патогенные бактерии могут заразить *C. elegans*, прикрепляясь к кутикуле, а коллективное кормление может снизить риск инфекций за счет уменьшения воздействия бактерий на поверхность [40]. Помимо того, на формируемый фенотип влияет наличие и концентрация аскаротидов, важных низкомолекулярных сигналов нематод. Различные комбинации аскаротидов опосредуют разные фенотипы и даже небольшие различия в их химической структуре часто связаны с сильно измененными профилями активности нематод [41].

Пробиотики

C. elegans стала полезной модельной системой для изучения врожденного иммунитета с точки зрения взаимодействия микробиота–хозяин [42]. Молекулярные пути, первоначально запускаемые патогенами, высоко консервативны у самых разных организмов, от насекомых и нематод до млекопитающих [43].

Пробиотиками животных могут быть разнообразные представители микробиома, включая *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp., *Pseudoalteromonas* spp. и т.д. [44–46]. Механизмы контроля заболеваний с помощью пробиотиков включают усиление иммунного ответа, конкурентную адгезию, антагонизм к патогенам и нарушение системы QS. Важным способом, с помощью которого пробиотики могут защитить хозяина от патогенных бактерий, является снижение колонизации бактериями кишечника хозяина и ингибирование последующего размножения бактерий, поддерживающее общий баланс состава микробиома кишечника хозяина [47]. Хотя многие исследования показали, что пробиотики обладают антибактериальной и противогрибковой активностью, основной механизм их действия состоит в снижении токсичности, вызванной инфекцией зоонозных патогенов, либо за счет вытеснения патогенов, либо нейтрализации токсичных молекул [48].

Модель *C. elegans* может быть использована не только для тестирования антимикробных препаратов, но и при поиске новых пробиотиков [49–51]. Релевантность *C. elegans* как модельного организма в исследованиях пробиотиков и при выяснении различных молекулярных механизмов связана с высо-

коконсервативными сигнальными путями, аналогичными системам высших млекопитающих [51, 52].

Бактерии, используемые для заражения *C. elegans*

На нематодах хорошо изучены эффекты, оказываемые грамотрицательными *P. aeruginosa* и грамположительными *Staphylococcus aureus* [53, 54], но в последнее время изучение патогенеза и формирования биопленок позволило применить существующие подходы и к другим видам патогенов (табл. 2).

C. elegans способна формировать специфичный ответ на бактериальные патогены на уровне транскриптома. Однако различные бактериальные патогены, включая *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* и *Photobacterium luminescens*, также активируют экспрессию одних и тех же генов врожденного иммунитета [55]. Все упомянутые бактериальные патогены вызывают колонизацию и вздутие просвета кишечника *C. elegans*. Колонизация *P. aeruginosa* приводит к активации генов иммунного ответа и реакции избегания патогенов у *C. elegans*. Раздувание просвета кишечника из-за микробной колонизации активирует гены иммунного ответа и нейроэндокринные пути, вызывая реакцию избегания [56]. Способность выявлять специфично регулируемые гены и метаболические пути у хозяина или патогена может идентифицировать новые метаболиты, продуцируемые бактериями, влияющими на физиологию хозяина [57].

Колонизация несколькими видами бактерий

Микробиота желудочно-кишечного тракта представляет собой сложную микробную экосистему. Влияние конкретных микроорганизмов на сигнальные пути хозяина может быть различным. Все больше данных подтверждают представление о том, что генетически обусловленная изменчивость хозяина определяет обилие конкретных таксонов, проживающих в организме [58]. Так, показана возможность сокультивирования нескольких патогенов в кишечнике нематоды [59]: двух [60] или трех [58] видов бактерий и даже перенести кишечный микробиом человека [61]. Такого рода эксперименты проводят, чтобы выяснить роль межвидовых взаимодействий в формировании микробных сообществ, связанных с хозяином. Экспериментальная микробная экология «снизу вверх» является инструментом для изучения динамики бактериальных сообществ кишечника модельного организма *C. elegans*, позволяя выяснить роль межвидовых взаимодействий в объединенной системе микробиом–хозяин, а также бактериальную конкуренцию в среде *in vivo* [62].

Таблица 2. Примеры работ за последние 10 лет с тестированием различных бактериальных возбудителей в модели инфекции *C. elegans*

Бактериальный патоген	Антибактериальное тестируемое вещество	Тип протокола	Примеры работ
<i>E. coli</i>	-	Liquid killing	[104]
	Бактериофаги		[87]
<i>A. baumannii</i>	Куркумин, флавоноиды	Liquid killing	[105]
	-	Slow killing	[106]
	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
<i>M. nematophilum</i>	-	Формирование фенотипа Dar	[107], [108]
<i>S. typhimurium</i>	-	Liquid killing	[109]
<i>S. aureus</i>	Амоксициклин	Liquid killing	[110]
	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[111]
	Ресвератрол, эконозол, параква	Slow killing	[74]
	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
	Panchgavya	Liquid killing	[50]
	<i>Lactobacillus curvatus</i> BGМК2-41	Slow killing	[43]
<i>S. gordonii</i>	-	Slow killing	[112]
<i>L. monocytogenes</i>	-	Slow killing	[113], [114]
<i>P. aeruginosa</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[111]
	Комбинация линезолида и полимиксина Б	Liquid killing	[73]
	Пеонол	Liquid killing	[115]
	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
	Бактериофаги	Liquid killing	[87]
	<i>B. megaterium</i> и <i>P. mendocina</i>	Slow killing	[52]
	Гентамицин	Slow killing	[116]
	<i>Holothuria atra</i>	Liquid killing	[117]
<i>Lactobacillus curvatus</i> BGМК2-41	Slow killing	[43]	
<i>S. marcescens</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[111]
<i>S. pyogenes</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[73]
<i>C. violaceum</i>	Экстракт листьев <i>P. guajava</i>	Liquid killing	[73]
<i>B. thuringiensis</i>	-	Liquid killing	[118]
	Липопептид тумолицин		[119]
<i>B. anthracis</i>	-	Slow killing	[120]
<i>E. faecalis</i>	Библиотека АМП	Liquid killing	[86]
	-	Slow killing	[55]
<i>E. faecium</i>	-	Slow killing	[55]
<i>B. cereacia</i>	-	Slow killing	[121]
<i>E. cloacae</i>	-	Slow killing	[122]
	Бактериофаги	Liquid killing	[87]
<i>B. cereus</i>	Карвакрол	Slow killing	[123]
<i>H. pylori</i>	Экстракт фукоидан	Slow killing	[124]
<i>S. pyogenes</i>	Фукугизид бифлавоноид	Liquid killing	[125]
<i>C. diphtheriae</i>	-	Формирование фенотипа Dar	[126]
<i>C. violaceum</i>	Пеонол	Liquid killing	[115]
<i>K. pneumoniae</i>	Бактериофаги	Liquid killing	[87]
	Линейка антибиотиков		[127]

ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ

Токсикологические тесты

Одним из первых направлений по тестированию веществ с использованием *C. elegans* в качестве модели стала проверка токсичности в жидкой культуре. Такого рода тесты проводили сначала через анализ «живой/мертвый», построение кривых выживаемости «доза–эффект» [63], а затем с помощью поведенческих тестов [63, 64] и оценки конкретных фенотипов [65–67]. В последующих исследованиях было показано, что нематода является подходящим организмом для изучения токсичности, а также для оценки эффективности некоторых лекарственных соединений.

Экспресс-исследования токсичности проводят и в настоящее время [68–70]. Часто использование такой модели позволяет проверить наличие токсической активности у бактерицидных препаратов, эффективность которых уже показана *in vitro* [71]. При этом тестируют не только растворы синтетических соединений [72], но и натуральные экстракты [73], наночастицы [73, 74] и природные изоляты [75, 76]. При помощи данной модели удалось найти способ снижения токсичности криопротектора, используемого в трансплантологии [77].

Скрининг соединений с использованием *C. elegans* позволяет предварительно оценить токсичность препарата, что позволяет исключить соединения, токсичные для хозяина, на ранних стадиях в то время как исследование *in vitro* идентифицирует только бактерицидные или бактериостатические соединения [78]. Нематод использовали в высокопроизводительном скрининге лекарств с целью оценки как токсичности, так и эффективности, этот подход к скринингу был коммерциализирован несколькими компаниями (Nagi Bioscience, *InVivo* Biosystems, Magnitude Biosciences) [79].

Скрининг лекарств

В модели инфекции нематоды существует ограниченный список вариантов доставки тестируемых веществ: доставка смешиванием раствора активного вещества с нематодами в жидкой питательной среде [80] или добавление в твердую среду [81]; доставка смешиванием раствора активного вещества с бактериальным источником питания (в том числе меченые бактерии) [82, 83].

Если рассмотреть такой способ доставки активного вещества, как упаковка его в микро- или наночастицы, то доставка станет одной из самых простых, но эффективных стратегий, которая будет имитировать естественное питание нематод путем

заглатывания частичек микронного размера, похожих на бактерии. При низком содержании пищи в среде нематоды могут снижать уровень накачки глотки, чтобы избежать поглощения непищевых частиц, но при их избытке большое количество инородных частиц все же попадает внутрь [84]. Данный метод позволит адресно доставлять активное вещество к возбудителю без токсического воздействия на ткани. Подобные методы будут полезны и для оценки фармакокинетики природных соединений [32]. Хотя нематоды являются многообещающей модельной системой для скрининга антимикробных соединений, они все же не могут полностью воспроизвести биологию млекопитающих. Например, нематоды обладают эффективной системой детоксикации, которая может ограничивать потенциальную идентификацию соединений, действующих путем модификации защитных систем хозяина [85].

Большое количество разных классов веществ проверяли на токсичность и эффективность в модели *C. elegans* [23–27]. Наиболее широкий спектр разнообразия представлен антимикробными соединениями, так как возможность вызвать инфекционный процесс с помощью разнообразных микроорганизмов у *C. elegans* позволяет получать большое количество тестируемых комбинаций патоген–антимикробный агент даже без учета возможности использования нескольких лекарственных средств одновременно.

C. elegans не имеет профессиональных иммунных клеток. Из-за отсутствия адаптивной иммунной системы эта нематода полагается исключительно на свою врожденную иммунную защиту, чтобы справиться с атакой патогена. В ответ на внешние раздражители запускается каскад реакций, который приводит к выделению антимикробных пептидов (АМП). АМП представляют собой биологически активные молекулы, вырабатываемые самыми разными организмами и являющиеся важным компонентом их врожденного иммунного ответа. Так, проверили действие небольшой библиотеки АМП и получили согласующиеся с общепринятыми данные об эффективности цекропиновых производных [86].

Впервые этот подход применили на модели *C. elegans* в сравнительно низкопроизводительном скрининге 7136 синтетических соединений и экстрактов натуральных продуктов на наличие активности против условного патогена человека *Enterococcus faecalis* [7] и показали, что 12 из них обеспечивали защиту хозяина *in vivo* в значительное более низких концентрациях, чем минимальные ингибирующие концентрации *in vitro*.

Модели заражения *C. elegans* позволяют проводить высокопроизводительный скрининг новых противомикробных молекул. Такого рода молекулы можно использовать в качестве зондов для определения новых механизмов бактериального патогенеза [12]. Показано также, что на этих моделях можно проверять антимикробную активность бактериофагов перед крупномасштабными доклиническими исследованиями на мышах [87]. Перспективным представляется также получение нематод-биосенсоров, реагирующих на изменение состава кишечного микробиома. Создан и биосенсор для анализа взаимодействия хозяина и микробиома в пищеварительном тракте [62].

Существуют работы, посвященные поиску новых веществ биоинформатическими методами в модели *C. elegans*. Например, с помощью базы данных DrugAge получен прогноз влияния некоторых веществ на продолжительность жизни нематод [88]. Такой подход может быть транслирован в предсказание влияния веществ и патогенов на нематоду путем создания базы данных о механизмах их действия. Еще одним способом анализа отклика нематод является оптогенетика. Применение оптических методов позволяет количественно контролировать метаболизм кишечных бактерий для оценки локального и системного влияния тестируемых веществ на здоровье нематод [89].

Микрофлюидные технологии как вариант перехода к персонализированному лечению

Возможность манипулирования одиночными живыми нематодами *C. elegans* при помощи микрофлюидики [76] широко используется в поведенческих исследованиях и микроскопии. Исследования в данной области сконцентрированы на поиске антибиотиков с использованием химических библиотек среднего размера, для чего подходят 384-луночные планшеты. Развитие и поведение *C. elegans* изучают с помощью разнообразных микрофлюидных технологий [78].

Использование любого микрофлюидного чипа обеспечивает низкий расход синтезируемых биоактивных молекул, таких как АМП, а также адресную доставку потенциальных лекарственных средств в небольшом объеме жидкости. Использование технологий микрофлюидных ловушек позволяет исключить влияние нематод друг на друга, поэтому естественным развитием разработанных подходов было бы использование высокопроизводительных микрофлюидных технологий скрининга, позволяющее перейти к анализу больших библиотек активных соединений.

Существующие платформы делятся главным образом на четыре типа: (1) платформы для на-

блюдения времени жизни и старения [90]; (2) платформы для скрининга токсичности и патогенеза; (3) платформы для изучения нейробиологических явлений и поведенческих тестов [91]; (4) платформы для поиска новых лекарственных препаратов. Большинство разработанных микрофлюидных чипов направлено на решение задач сортировки и исследования личиночных стадий нематоды.

Значительные преимущества микрофлюидики привели к разработке устройств для измерения кривых выживания. Показано, что процесс микрофлюидной инкапсуляции нематод в единичных компартментах не влияет на продолжительность жизни нематод [92]. Аналогичные разработки в сфере микрофлюидных технологий позволяют обеспечить переход от трудоемких экспериментов на чашках Петри к автоматизированным и производительным платформам отбора кандидатов. Побочные продукты метаболизма накапливаются у червей и бактерий, а биологическое состояние бактерий изменяется в ответ на воздействие стрессовых факторов, которое может оказывать вторичное воздействие на червей. Хотя этот эффект можно свести к минимуму за счет периодического перевода животных на новые чашки, физические манипуляции могут привести к дополнительному стрессу и потере части популяции. Возможность точно и быстро контролировать окружающую среду – одно из многих преимуществ микрофлюидных устройств [93]. Также существует ряд ответов на голодание как на фактор стресса. Одной из таких реакций является прекращение яйцекладки во взрослом возрасте. Прекращение яйцекладки приводит к матрицидному внутреннему вылуплению потомства, которое впоследствии мать использует в качестве источника пищи. Такие данные обычно цензурируются при статистической обработке [94].

Применение микрофлюидных технологий решает такие задачи автоматизации, как: (1) программный контроль потоков жидкости, оперирование малыми объемами активных веществ; (2) равномерное дозирование нематод по объему; (3) компартиментализация, в том числе путем сортировки, и фенотипическое профилирование отдельных особей; (4) долгосрочное культивирование в относительно постоянных условиях внешней среды; (5) мониторинг в режиме реального времени, отслеживание нескольких контрольных точек.

С помощью микрофлюидного чипа с фильтрацией от потомства можно также обеспечить исследование состаренной популяции без использования стерилизации химическими способами (FUDR) или часто-

го переноса с чашки на чашку, что позволяет избежать использования стерильных штаммов [95]. Имобилизация единичных нематод в канале может служить отличным способом получения изображений высокого разрешения в режиме реального времени [96].

Основным недостатком многих созданных устройств является то, что *C. elegans* плавает в специально спроектированных камерах, подобно жидким культурам в многолуночных планшетах. Физиологически плавание в жидкой культуре более энергозатратно, чем ползание, а также увеличивает период сна, что усложняет процедуру фенотипирования [97]. В то время как личинки *C. elegans* демонстрируют покой во время летаргуса, у взрослых червей покой наблюдается только в нескольких ситуациях, например, после нескольких часов плавания или после воздействия экстремальных условий окружающей среды. В более широком контексте, сон, вызванный потоковыми явлениями, определен как поведение, при котором экспериментально контролируемые внешние воздействия сильно влияют на то, как часто животное переходит между поведенческими состояниями.

Плавающие и ползающие черви демонстрируют существенно разные профили экспрессии генов и продолжительность жизни [98]. Поэтому предполагается, что результаты, полученные с помощью устройств, в которых черви ползают, а не плавают, будут более сопоставимы с результатами, полученными на твердой среде. Проблему отсутствия подвижности у многих особей можно решить, используя свет, стимулирующий к пробуждению и движению [99].

Внедрение микрофлюидных подходов к расширенной визуализации динамики бактериальных колоний и кинетики пищеварения *in vivo* открывает путь к повышению информативности, пропускной способности и универсальности способов, направленных на оценку взаимодействия микробиоты с кишечником *C. elegans*. Микрофлюидные платформы для параллельных исследований на чипе основаны на кормлении червей различными бактериальными штаммами и/или применении противомикробных соединений [100]. Иммунный ответ измеряли по экспрессии гена иммунного ответа *irg-1* и использовали для наблюдения изменений экспрессии при воздействии патогенного бактериального штамма *P. aeruginosa* [101]. Наиболее общим в платформах данного типа является фенотипический анализ особей в режиме реального времени и построение кривых выживаемости по полученным данным [102].

Микрофлюидная технология, позволяющая исследовать бактериальный патогенез, продемонстрирована в системе Celab [102]. Технология совмещает возможности других устройств для проведения высокопроизводительного мониторинга, долгосрочной микрофлюидной инкубации червей, индивидуального отслеживания и полуавтоматических измерений с промывкой потомства и пополнением запасов пищи.

Таким образом, микрофлюидика позволяет проводить «персонализированное» фенотипирование, поскольку микрофлюидные чипы позволяют собирать индивидуальные реакции на протяжении всей жизни червей [103]. Современные микрофлюидные системы включают устранение необходимости повторного перемещения взрослых особей вручную во время тестов на выживаемость, сортировки потомства, а также избегание стресса, вызванного плаванием, на протяжении всей жизни животных, выращенных в жидкости. Таким образом, сокращается общее количество подвергнутых цензуре червей [93].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модель инфекции в *C. elegans* можно эмпирически использовать как систему хозяин–патоген для определения вирулентности нового патогена при исследовании врожденного иммунного ответа. Большинство работ по изучению кишечной инфекции в *C. elegans* были выполнены с использованием монобактериальной культуры, однако в естественных условиях микробиом представлен сложным консорциумом микроорганизмов. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования по сокультивированию нескольких видов.

Логичным продолжением развития рассмотренных в настоящем обзоре технологий станет создание микрофлюидного устройства, обеспечивающего стадию заражения нематод, с последующим тестированием библиотек потенциальных антиинфекционных соединений на уже инфицированных особях. Для создания такого устройства необходимо иметь возможность формирования стабильной инвазивной инфекции в кишечнике нематоды, а также персонализированной доставки тестируемых соединений и наблюдения их действий. Поскольку микрофлюидика масштабируема и адаптируема, микрофлюидное устройство можно использовать не только для фундаментальных исследований патогенеза, но и для высокопроизводительного скрининга молекул-кандидатов.

Перспективным направлением является объединение использования предлагаемой платформы инфицирования и скрининга на *C. elegans* с техно-

логией синтетических библиотек биоразнообразия антимикробных пептидов. Область разработки антимикробных пептидов страдает от отсутствия высокотехнологичной системы высокопроизводительного синтеза и тестирования пептидов-кандидатов. Формирование в *C. elegans* синтетической микро-

биоты продуцентов антимикробных пептидов позволит заполнить этот пробел. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00331.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gensini G.F., Conti A.A., Lippi D. // *Journal of Infection*. 2007. V. 54(3). P. 221–224.
- <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/5/1073>. (Accessed August 14, 2024)
- Lewis K. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. V. 85. № 12. P. 1469–1483.
- Clatworthy A.E., Romano K.P., Hung D.T. // *Nat. Chem. Biol.* 2018. V. 14. № 4. P. 331–341.
- Pujol N., Cypowyj S., Ziegler K., Millet A., Astrain A., Goncharov A., Jin Y., Chisholm A.D., Ewbank J.J. // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. № 7. P. 481–489.
- Nass R., Hamza I. // *Curr. Protoc. Toxicol.* 2007. V. 31. № 1. P. 1.9.1–1.9.18.
- Moy T.I., Ball A.R., Anklesaria Z., Casadei G., Lewis K., Ausubel F.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 27. P. 10414–10419.
- Powell J.R., Ausubel F.M. // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 415. P. 403–427.
- Balla K.M., Troemel E.R. // *Cell Microbiol.* 2013. V. 15. № 8. P. 1313–1322.
- Desai S.K., Padmanabhan A., Harshe S., Zaidel-Bar R., Kenney L.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. № 25. P. 12462–12467.
- Kim W., Hendricks G.L., Lee K., Mylonakis E. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2017. V. 12. № 6. P. 625–633.
- Peterson N.D., Pukkila-Worley R. // *Curr Opin Immunol.* 2018. V. 54. P. 59–65.
- Pukkila-Worley R., Feinbaum R., Kirienko N.V., Larkins-Ford J., Conery A.L., Ausubel F.M. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P. e1002733.
- Kim W., Zhu W., Hendricks G.L., van Tyne D., Steele A.D., Keohane C.E., Fricke N., Conery A.L., Shen S., Pan W., et al. // *Nature*. 2018. V. 556. № 7699. P. 103–107.
- Siddhardha B., Dyavaiah M., Syed A. Model organisms for microbial pathogenesis, biofilm formation and antimicrobial drug discovery. Springer Nature, 2020. P. 684.
- Ausubel F.M. // *Nat. Immunol.* 2005. V. 6. № 10. P. 973–979.
- Helmcke K.J., Avila D.S., Aschner M. // *Neurotoxicol. Teratol.* 2010. V. 32. № 1. P. 62–67.
- Kim D.H., Ausubel F.M. // *Curr. Opin. Immunol.* 2005. V. 17. № 1. P. 4–10.
- Khan F., Jain S., Oloketuyi S.F. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 215. P. 102–113.
- Stuhr N.L., Curran S.P. // *MicroPubl. Biol.* 2023. V. 2023. P. 10.17912/micropub.biology.000902.
- Shtonda B.B., Avery L. // *J. Exp. Biol.* 2006. V. 209. Pt 1. P. 89–102.
- Lee Y.-T., Wang M.C. // *Dev. Cell.* 2019. V. 49. № 1. P. 7–9.
- Walker A.C., Bhargava R., Vaziriyani-Sani A.S., Brust A.S., Czyz D.M. // *Bio Protoc.* 2022. V. 12. № 2. P. e4291.
- Höss S., Römbke J. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. V. 26. № 25. P. 26304–26312.
- Wang L., Graziano B., Bianchi L. // *STAR Protoc.* 2023. V. 4. № 2. P. 102241.
- Wibisono P., Sun J. // *STAR Protoc.* 2022. V. 3. № 3. P. 101558.
- Moore R.S., Kaletsky R., Murphy C.T. // *STAR Protoc.* 2021. V. 2. № 1. P. 100384.
- Manan A., Bazai Z.A., Fan J., Yu H., Li L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 12. P. 3915.
- Kang D., Kirienko D.R., Webster P., Fisher A.L., Kirienko N.V. // *Virulence*. 2018. V. 9. № 1. P. 804–817.
- Qi B., Han M. // *Cell*. 2018. V. 175. № 2. P. 571–582.e11.
- Yang Z.-Z., Yu Y.-T., Lin H.-R., Liao D.-C., Cui X.-H., Wang H.-B. // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 129. P. 310–322.
- Ha N.M., Tran S.H., Shim Y.-H., Kang K. // *Appl. Biol. Chem.* 2022. V. 65. № 1. P. 18.
- Fayolle M., Morsli M., Gelis A., Chateauraynaud M., Yahiaoui-Martinez A., Sotto A., Lavigne J.-P., Dunyach-Remy C. // *Genes (Basel)*. 2021. V. 12. № 12. P. 1883.
- Caldwell G.A. // *Dis. Model. Mech.* 2023. V. 16. № 6. P. dmm050333.
- Vasquez-Rifo A., Veksler-Lublinsky I., Cheng Z., Ausubel F.M., Ambros V. // *Genome Biol.* 2019. V. 20. № 1. P. 270.
- Kim D.H., Flavell S.W. // *J. Neurogenet.* 2020. V. 34. № 3–4. P. 500–509.
- Feigman M.S., Kim S., Pidgeon S.E., Yu Y., Ongwae G.M., Patel D.S., Regen S., Im W., Pires M.M. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. 25. № 10. P. 1185–1194.e5.
- Kaito C., Murakami K., Imai L., Furuta K. // *Microbiol. Immunol.* 2020. V. 64. № 9. P. 585–592.
- Perni M., Casford S., Aprile F.A., Nollen E.A., Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. // *J. Vis. Exp.* 2018. № 141. P. 1352–1362.
- Ding S.S., Romenskyy M., Sarkisyan K.S., Brown A.E.X. // *Genetics*. 2020. V. 214. № 3. P. 577–587.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153595/>. (Accessed December 6, 2024)
- Kumar A., Baruah A., Tomioka M., Ino Y., Kalita M.C., Khan M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2020. V. 77. № 7. P. 1229–1249.
- Dinić M., Jakovljević S., Đokić J., Popović N., Radojević D., Strahinić I., Golić N. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 21258.
- Roselli M., Schifano E., Guantario B., Zinno P., Uccelletti D., Devirgiliis C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 20. P. 5020.
- Sugawara T., Sakamoto K. // *Br. J. Nutr.* 2018. V. 120. № 8. P. 872–880.
- <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/1/537>. (Accessed August 14, 2024)
- Li Y.-X., Wang N.-N., Zhou Y.-X., Lin C.-G., Wu J.-S., Chen X.-Q., Chen G.-J., Du Z.-J. // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19. № 3. P. 150.
- Wang B., Zhou Y., Wang Q., Xu S., Wang F., Yue M., Zeng Z., Li W. // *Cells*. 2023. V. 12. № 10. P. 1438.
- Wu-Chuang A., Bates K.A., Obregon D., Estrada-Peña A., King K.C., Cabezas-Cruz A. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 14045.
- Patel P., Joshi C., Funde S., Palep H., Kothari V. // *F1000Res*. 2018. V. 7. P. 1612.
- Sharma K., Pooranachithra M., Balamurugan K., Goel G. // *Microb. Pathog.* 2019. V. 127. P. 39–47.

52. Mahesh R., Ilangovan P., Nongbri D., Suchiang K. // *Indian J. Microbiol.* 2021. V. 61. № 4. P. 404–416.
53. Matsunami K. // *Front Nutr.* 2018. V. 5. P. 111.
54. Schifano E., Marazzato M., Ammendolia M.G., Zanni E., Ricci M., Comanducci A., Goldoni P., Conte M.P., Uccelletti D., Longhi C. // *Microbiologyopen.* 2019. V. 8. № 6. P. e00756.
55. Yuen G.J., Ausubel F.M. // *Virulence.* 2018. V. 9. № 1. P. 683–699.
56. Singh J., Aballay A. // *Dev. Cell.* 2019. V. 49. № 1. P. 89–99.e4.
57. Chan J.P., Wright J.R., Wong H.T., Ardasheva A., Brumbaugh J., McLimans C., Lamendella R. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 5545.
58. Ortiz A., Vega N.M., Ratzke C., Gore J. // *ISME J.* 2021. V. 15. № 7. P. 2131–2145.
59. Herman M.A., Irazoqui J.E., Samuel B.S., Vega N. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. P. 1035545.
60. Pike V.L., Stevens E.J., Griffin A.S., King K.C. // *Parasitology.* 2023. V. 150. № 9. P. 805–812.
61. Walker A.C., Bhargava R., Vaziriyani-Sani A.S., Pourciau C., Donahue E.T., Dove A.S., Gebhardt M.J., Ellward G.L., Romeo T., Czyż D.M. // *PLoS Pathog.* 2021. V. 17. № 5. P. e1009510.
62. Rutter J.W., Ozdemir T., Galimov E.R., Quintaneiro L.M., Rosa L., Thomas G.M., Cabreiro F., Barnes C.P. // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. № 12. P. 2620–2628.
63. Peres T.V., Arantes L.P., Miah M.R., Bornhorst J., Schwerdtle T., Bowman A.B., Leal R.B., Aschner M. // *Neurotox. Res.* 2018. V. 34. № 3. P. 584–596.
64. Kudelska M.M., Lewis A., Ng C.T., Doyle D.A., Holden-Dye L., O'Connor V.M., Walker R.J. // *Invert. Neurosci.* 2018. V. 18. № 4. P. 14.
65. Yan J., Zhao N., Yang Z., Li Y., Bai H., Zou W., Zhang K., Huang X. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 50. P. 17323–17336.
66. Lenz K.A., Miller T.R., Ma H. // *Chemosphere.* 2019. V. 214. P. 60–69.
67. Kim S., Lee J.-H., Kim Y.-G., Tan Y., Lee J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 18. P. 10683.
68. Yu Z., Yin D., Hou M., Zhang J. // *Chemosphere.* 2018. V. 211. P. 278–285.
69. Schultz C.L., Lahive E., Lawlor A., Crossley A., Puentes V., Unrine J.M., Svendsen C., Spurgeon D.J. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2018. V. 37. № 10. P. 2609–2618.
70. Moyson S., Town R.M., Joosen S., Husson S.J., Blust R. // *J. Appl. Toxicol.* 2019. V. 39. № 2. P. 282–293.
71. Pormohammad A., Firrincieli A., Salazar-Alemán D.A., Mohammadi M., Hansen D., Cappelletti M., Zannoni D., Zarei M., Turner R.J. // *Microbiol. Spectr.* 2023. V. 11. № 4. P. e00628–23.
72. Zhou D. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2018. V. 37. № 10. P. 2560–2565.
73. Huang T., Zeng M., Fu H., Zhao K., Song T., Guo Y., Zhou J., Zhai L., Liu C., Prithiviraj B., et al. // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2022. V. 21. № 1. P. 38.
74. Mizdal C.R., Stefanello S.T., da Costa Flores V., Agertt V.A., Bonez P.C., Rossi G.G., da Silva T.C., Antunes Soares F.A., de Lourenço Marques L., de Campos M.M.A. // *Microb. Pathog.* 2018. V. 123. P. 440–448.
75. Moon J., Kwak J.I., An Y.-J. // *Chemosphere.* 2019. V. 215. P. 50–56.
76. Lee S., Kim Y., Choi J. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. V. 187. P. 109777.
77. Tedesco P.M., Schumacher G.J., Johnson T.E. // *Cryobiology.* 2019. V. 86. P. 71–76.
78. Mir D.A., Balamurugan K. // *Biofouling.* 2019. V. 35. № 8. P. 900–921.
79. Kukhtar D., Fussenegger M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120. № 8. P. 2056–2071.
80. Gemeinder J.L.P., Barros N.R. de, Pegorin G.S., Singulani J. L., Borges F.A., Arco M.C.G.D., Giannini M.J.S.M., Almeida A.M.F., Salvador S.L. S., Herculano R.D. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2021. V. 32. № 1. P. 93–111.
81. Li J., Chotiko A., Chouljenko A., Gao C., Zheng J., Sathivel S. // *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2019. V. 70. № 2. P. 172–181.
82. Qu M., Xu K., Li Y., Wong G., Wang D. // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 643. P. 119–126.
83. Yang Y., Xu G., Xu S., Chen S., Xu A., Wu L. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 165. P. 291–298.
84. Fueser H., Rauchschalbe M.-T., Höss S., Traunspurger W. // *Aquat. Toxicol.* 2021. V. 235. P. 105827.
85. Chen J., Yang Y., Yao H., Bu S., Li L., Wang F., Chen F., Yao H. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. P. 818308.
86. Jayamani E., Rajamuthiah R., Larkins-Ford J., Fuchs B.B., Conery A.L., Vilcinskis A., Ausubel F.M., Mylonakis E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 3. P. 1728–1737.
87. Manohar P., Loh B., Elangovan N., Loganathan A., Nachimuthu R., Leptihn S. // *Microbiol. Spectr.* 2022. V. 10. № 1. P. e0139321.
88. Ribeiro C., Farmer C.K., de Magalhães J.P., Freitas A.A. // *Aging (Albany NY).* 2023. V. 15. № 13. P. 6073–6099.
89. Hartsough L.A., Park M., Kotlajich M.V., Lazar J.T., Han B., Lin C.-C.J., Musteata E., Gambill L., Wang M.C., Tabor J.J. // *Elife.* 2020. V. 9. P. e56849.
90. Rezaeianaran F., Gijs M.A.M. // *RSC Adv.* 2023. V. 13. № 25. P. 17230–17243.
91. Katzen A., Chung H.-K., Harbaugh W.T., Della Iacono C., Jackson N., Glater E.E., Taylor C.J., Yu S.K., Flavell S.W., Glimcher P.W., et al. // *Elife.* 2023. V. 12. P. e69779.
92. Wu J., Gao Y., Xi J., You X., Zhang X., Zhang X., Cao Y., Liu P., Chen X., Luan Y. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 245. P. 114089.
93. Lee K.S., Lee L.E., Levine E. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 35862.
94. Banse S.A., Blue B.W., Robinson K.J., Jarrett C.M., Phillips P.C. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 5. P. e0216283.
95. Saberi-Bosari S., Huayta J., San-Miguel A. // *Lab. Chip.* 2018. V. 18. № 20. P. 3090–3100.
96. Levine E., Lee K.S. // *Anim. Cells Syst (Seoul).* 2020. V. 24. № 6. P. 311–320.
97. Rahman M., Edwards H., Birze N., Gabriliska R., Rumbaugh K.P., Blawdziewicz J., Szewczyk N.J., Driscoll M., Vanapalli S.A. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 16190.
98. Laranjeiro R., Harinath G., Hewitt J.E., Hartman J.H., Royal M.A., Meyer J.N., Vanapalli S.A., Driscoll M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 47. P. 23829–23839.
99. Gonzales D.L., Zhou J., Fan B., Robinson J.T. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 5035.
100. Viri V., Arveiler M., Lehnert T., Gijs M.A.M. // *Micromachines (Basel).* 2021. V. 12. № 7. P. 832.
101. Midkiff D., San-Miguel A. // *Molecules.* 2019. V. 24. № 23. P. 4292.
102. Sohrabi S., Cota V., Murphy C.T. // *Lab on a Chip.* 2023. V. 12. P. 2738–2757.
103. Atakan H.B., Xiang R., Cornaglia M., Mouchiroud L., Katsyuba E., Auwerx J., Gijs M.A.M. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 14340.
104. Zhou M., Liu X., Yu H., Yin X., Nie S.-P., Xie M.-Y., Chen W., Gong J. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 1745.
105. Raorane C.J., Lee J.-H., Kim Y.-G., Rajasekharan S.K., García-Contreras R., Lee J. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 990.

106. Espinal P., Pantel A., Rolo D., Marti S., López-Rojas R., Smani Y., Pachón J., Vila J., Lavigne J.-P. // *Microb. Drug Resist.* 2019. V. 25. № 5. P. 752–760.
107. Gravato-Nobre M.J., Nicholas H.R., Nijland R., O'Rourke D., Whittington D.E., Yook K.J., Hodgkin J. // *Genetics.* 2005. V. 171. № 3. P. 1033.
108. Hodgkin J., Kuwabara P.E., Corneliussen B. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 24. P. 1615–1618.
109. Aballay A., Ausubel F.M. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. V. 5. № 1. P. 97–101.
110. Kong C., Tan M.-W., Nathan S. // *Biol. Open.* 2014. V. 3. № 7. P. 644–655.
111. Patel P., Joshi C., Birdi T., Kothari V. // *F1000Res.* 2019. V. 8. P. 12.
112. Naji A., Houston IV J., Skalley Rog C., Al Hatem A., Rizvi S., van der Hoeven R. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 8. P. e0202233.
113. Ke T., Santamaría A., Tinkov A.A., Bornhorst J., Aschner M. // *Curr. Protoc. Toxicol.* 2020. V. 84. № 1. P. e94.
114. Yang K.H., Yun B., Choi H.J., Ryu S., Lee W.J., Oh M.-H., Song M.-H., Kim J.N., Oh S., Kim Y., et al. // *Food Sci. Anim. Resour.* 2019. V. 39. № 1. P. 84–92.
115. Yang D., Hao S., Zhao L., Shi F., Ye G., Zou Y., Song X., Li L., Yin Z., He X., et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 692474.
116. Chadha J., Ravi, Singh J., Chhibber S., Harjai K. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. P. 899566.
117. Wang H., Chu W., Ye C., Gaeta B., Tao H., Wang M., Qiu Z. // *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2019. V. 103. № 2. P. 903–915.
118. Wan L., Lin J., Du H., Zhang Y., Bravo A., Soberón M., Sun M., Peng D. // *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21. № 3. P. 1086–1098.
119. Zheng D., Zeng Z., Xue B., Deng Y., Sun M., Tang Y.-J., Ruan L. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 215. P. 22–28.
120. Turner M.J., Cox J.K., Spellman A.C., Stahl C., Bavari S. // *Dev. Comp. Immunol.* 2020. V. 102. P. 103453.
121. Pande A., Veale T.C., Grove A. // *Infect. Immun.* 2018. V. 86. № 9. P. e00322-18.
122. Khan S., Paravastu P., Jha P.N., Marathe S.A. // *Microb. Pathog.* 2020. V. 148. P. 104449.
123. Rajabli N., Williamson L., Nimmer P.S., Kelly-Worden M., Bange J.S., Ho Y., McKillip J.L. // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2018. V. 9. № 2. P. 11–21.
124. Palacios-Gorba C., Pina R., Tortajada-Girbés M., Jiménez-Belenguer A., Siguemoto É., Ferrús M.A., Rodrigo D., Pina-Pérez M.C. // *Food Funct.* 2020. V. 11. № 5. P. 4525–4534.
125. Nandu T.G., Subramenium G.A., Shiburaj S., Viszwapriya D., Iyer P.M., Balamurugan K., Rameshkumar K.B., Karutha Pandian S. // *J. Med. Microbiol.* 2018. V. 67. № 9. P. 1391–1401.
126. Chen Y.-W., Ton-That H. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2020. V. 58. № 1. P. e109.
127. Yao H., Xu A., Liu J., Wang F., Yao H., Chen J. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 973551.