

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико - профилактический факультет с отделением биологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

*На правах рукописи*



**Зигангирова Нурия Нажибовна**

**МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ  
ДНК ОСТРОВА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ (*pks*) *ESCHERICHIA COLI*  
NC101 В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА.**

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор



А. Р. Мавзютов

Уфа- 2018

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Предпосылки развития рака	7
1.2. Микробиота- метаболический «орган»	9
1.3. Образование и роль биопленки	12
1.4. Нарушение микробиоты	13
1.5. Штамм <i>E. coli</i> NC101	16
1.6. Колибактин- новый бактериальный токсин	18
1.7. Колибактин и колоректальный рак	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1. Лабораторное обследование больных	23
2.2. Выделение ДНК бактерий из кала	23
2.3. Депарафинизация и оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин	26
2.4. Выбор праймеров для исследования	27
2.5. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции	28
2.6. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле	32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1. Проверка выделенной ДНК из биоптатов	33
3.2. Выбор праймеров к островкам патогенности <i>pks</i>	34
3.3. Детекция «острова» патогенности <i>pks</i> в образцах кала	34
3.4. Детекция «острова» патогенности <i>pks</i> в биоптатах при воспалительных заболеваниях	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	38
ВЫВОДЫ	39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	40
ПРИЛОЖЕНИЕ	52

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

БК- болезнь Крона

ВЗК- воспалительные заболевания кишечника

ЖКТ- желудочно- кишечный тракт

КРР- колоректальный рак

КЦЖК- короткоцепочечные жирные кислоты

ОП- «острова» патогенности

ССЗ- сердечно- сосудистые заболевания

ЯК- язвенный колит

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Данные Всемирной организации Здравоохранения свидетельствуют о том, что рак является одной из основных причин смертности во всем мире. Онкологическая патология по количеству смертельных исходов уступает только сердечно-сосудистым заболеваниям. Каждый год во всем мире от рака умирает более 7,5 миллионов человек.

Одним из распространенных видов карцином считается рак толстой кишки. Под этим термином понимают образование злокачественной эпителиальной опухоли кишки различной формы, локализации и гистологической структуры. С каждым годом количество больных возрастает. В России рак толстой кишки занимает 4-е место среди других онкологических заболеваний.

В настоящее время актуальным направлением в исследовании рака толстой кишки является изучение видовой структуры сообщества симбиотических микроорганизмов и закономерностей ее организации (Варичев и др., 2012). Одним из таких микроорганизмов является *Escherichia coli*. Они относятся к условно-патогенной микрофлоре кишечника и находятся в эпителиальной слизи. Однако высокая пластичность генома *E. coli* дает огромный потенциал для развития и появления штаммов патогенных микроорганизмов из комменсальных штаммов (Bouguened et al., 2006), например, через обмен любыми генетическими элементами разных типов бактерий между собой и с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae* (Иванова и др., 2014). Патогенные изоляты *E. coli* являются основной причиной бактериальных диарей во всем мире (Bouguened et al., 2006). Они обладают генами, кодирующими различные факторы вирулентности, которые часто иммобилизуются на мобильных генетических элементах, такие как бактериофаги, плазмиды и «острова» («островки») патогенности

(Sokurenko et al., 1999; Ochman et al., 2000; Мавзютов, Фиалкина, Бондаренко, 2002; Alfredo et al., 2005; Croxen et al., 2010).

«Островки патогенности» (ОП) – разновидность генетических островков, содержащих от одного до нескольких десятков генов, кодирующих факторы патогенности, и способных к одновременной горизонтальной внутривидовой и межвидовой передаче. Островки патогенности присутствуют только у вирулентных микроорганизмов в составе плазмид или бактериальной хромосомы. Доказано, что этиологической значимостью обладает *E.coli*, эти бактерии могут привести к повреждению ДНК в клетках кишечника и способствовать развитию рака толстой кишки (Christine Hsu, 2012).

Существуют некоторые штаммы *E coli*, которые содержат геномный остров поликетидсинтазы (*pks*), чья функция заключается в кодировании мультиферментативного механизма, который производит генотоксическое вещество, называемое колибактин. Колибактин может вызывать клеточное старение или рак, повреждая ДНК. Тем не менее, барьер слизистой оболочки препятствует достижению *E. coli* к поверхности энтероцитов. Только тогда, когда совместно с инфекцией *E. coli* развиваются некоторые воспалительные поражения, бактерия способна вводить колибактин в энтероциты, вызывая развитие опухоли (Holmes et al., 2008). Островки генотоксичности являются маркерами того, что *E. coli* является одной из причин развития рака толстой кишки.

**Цель исследования.** Оценка роли вариантов *E coli* NC 101, несущих острова *pks* в этиологии воспалительных заболеваний кишечника.

**Задачи исследования:**

1. Сбор клинического материала.
2. Выделение ДНК из биоптатов кишечника и кала у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

3. Выбор праймеров к островкам патогенности *pks* и оптимизация их работы для молекулярно-генетической идентификации.

4. Подбор оптимального метода генетической идентификации.

5. Сравнение результатов молекулярно-генетической детекции ДНК из биоптатов и ДНК из кала.

**Научная новизна.** Данная тест система может применяться для амплификации и секвенирования поликетидной синтетазы генотоксических островов *E coli* NC 101 в биоптатах кишечника и в кале, с целью обнаружения влияния на развитие рака толстой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника.

**Практическая значимость.** Применение тест системы для ранней диагностики рака толстой кишки.

**Область применения результатов исследования.** В клинической медицине для выявления и дальнейших действий при воспалительных заболеваниях кишечника с целью профилактики развития рака толстой кишки.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Предпосылки развития рака

Важность проблемы неспецифического язвенного колита (ЯК) и болезни Крона (БК), объединяемых сегодня общим термином «воспалительные заболевания кишечника» (ВЗК), обусловлена продолжающимся ростом частоты и распространенности этой патологии, прогрессирующим течением и тяжестью осложнений, приводящих к инвалидности и смерти. Развитие ЯК и БК в основном в молодом возрасте (15- 25 лет) делает эту проблему не только медицинской, но и социальной (Григорьева, 2011). На фоне длительно и активно (на микроскопическом уровне) текущего ЯК риск развития колоректальных новообразований значительно повышается. Биологический механизм такого неопластического процесса отличается от традиционной последовательности «аденома - рак» и связан с микросателлитной нестабильностью ДНК клетки, приводящий к быстрому и неконтролируемому злокачественному росту (Vind et al., 2006).

Колоректальный рак (КРР) является основной и одной из главных проблем общественного здравоохранения в мире (Siegel et al., 2014). На его долю приходится более 9% всех случаев рака. Это третья самая распространенная форма в мире, а в структуре смертности от злокачественных новообразований он занимает 4 место. Имеются существенные различия в географии глобального распределения КРР. Он является главным заболеванием развитых стран с европейской культурой. Заболеваемость значительно растет, особенно в странах с быстро развивающейся экономикой высоким уровнем доходов (Огнерубов и др., 2015).

Термин «колоректальный рак» включает в себя опухоли ободочной и прямой кишки. Рак прямой кишки занимает второе место среди всех

опухолей кишечника (28%) после нисходящей ободочной кишки (42%). В России в 2013 г диагноз КРР установлен впервые у 61142 человек, при этом рак ободочной кишки выявлен у 34792 лиц, а прямой кишки- у 26350. Умерло от КРР в 2013 г 21276 женщин и 17476 мужчин (Каприн, 2015). Разработка скрининговых программ способствовала снижению заболеваемости КРР примерно на 3% в течение 10 лет, поскольку они способствовали выявлению предраковых заболеваний- полипов (Jemal et al., 2013). Именно ворсинчатые и тубулярные аденомы являются предраковыми заболеваниями толстой кишки. Почти 95% спорадических случаев КРР развиваются именно из аденом. С момента появления до малигнизации проходит от 5 до 10 лет (Davies, 2009). В связи с этим улучшение диагностики и лечения (удаления аденом) на этих этапах может снизить риск развития КРР (Grande, 2008). С точки зрения этиологии, определенную роль играют «семейные истории», а также генетические факторы риска (Boardman, 2007). Примерно от 5 до 20% случаев причиной развития КРР являются генетические факторы (Jeter et al., 2008). Наличие в анамнезе воспалительных заболеваний толстого кишечника ЯК и БК повышают общий риск развития КРР от 4 до 20 раз. Весьма убедительна «экологическая теория» развития рака толстого кишечника (Johnson et al., 2007). Диеты с высоким содержанием жира (особенно животного- питание по западному типу) являются основным фактором риска для КРР (Santarelli et al., 2008). В связи с этим изменение привычек питания может на 70% сократить роль его в этиологии данного заболевания (Willett et al., 2005).

Вероятность заболевания колоректальным раком повышается после 40 лет и резко увеличивается после 50 лет (Ries, 2008). Причем 90% случаев КРР встречается у людей от 50 лет и старше. Рак прямой кишки в основном выявляется в возрасте 65 лет (Fazeli et al., 2015). Тем не менее, имеются сведения, что частота встречаемости у молодых увеличивается. Так в США КРР в настоящее время является одним из 10 наиболее часто встречающихся локализаций у лиц обоего пола в возрасте 20 - 49 лет

(Fairley, 2006). На сегодняшний день в литературе приведена масса доказательств того, что эпидемиология, механизмы канцерогенеза, гистологическое строение, молекулярные изменения и, наконец, клиническая картина КРР зависят от локализации по длине толстой кишки (Yamauchi et al., 2012).

Профилактика и раннее выявление КРР являются одними из неотложных потребностей в общественном здравоохранении (Shimpo et al., 2017).

## **1.2. Микробиота - метаболический «орган»**

Важнейшее значение в состоянии здоровья и самочувствия человека имеет микрофлора кишечника. Изучение микробиоты кишечника и ее симбиотических и патогенных взаимодействий с организмом человека является одной из важнейших областей биомедицинской науки. Не вызывает сомнения, что микробиота человека - метаболический «орган», который не только участвует в переваривании пищи, но и выделяет различные биологически активные вещества, стимулирует функции врожденного и приобретенного иммунитета, препятствует инвазии патогенных микроорганизмов, выполняет детоксикационную, антиканцерогенную, синтетическую функции (Кучумова, 2011).

Формирование микробиома кишечного тракта человека - многоэтапный процесс. Традиционно считалось, что колонизация желудочно-кишечного тракта микроорганизмами происходит после рождения. Однако, исследования последних лет показали, что микроорганизмы присутствуют в плаценте, амниотической жидкости, пуповинной крови, меконии (Каштанова, Ткачева и др., 2016). Таким образом, становление микробиоты начинается еще *in utero* за счет бактерий, проникающих из кишечника, ротовой полости, вагинальной микробиоты матери, затем при прохождении ребенка через родовые пути

(Stinson et al., 2017). После с грудным молоком, которое нестерильно и содержит значительные концентрации бактерий родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* и *Bifidobacterium* (Fitztevens et al., 2016). Вскоре после рождения формируется типичный детский тип микробиоты кишечника, характеризующийся высоким содержанием представителей рода *Bifidobacterium*, что в значительной степени определяется содержащимся в материнском молоке набором олигосахаридов. К двум годам относительное количество *Bifidobacterium* постепенно убывает и складывается окончательный вариант кишечной микробиоты (Jakobsson et al., 2016). Неправильное питание матери во время беременности или ребенка в раннем детском возрасте может привести к обеднению и дефекту микробиоты кишечника. Предполагают, что окончательное становление так называемого энтеротипа или фекотипа начинается с 18 месяцев. Примерно к 2 - 3 годам микрофлора претерпевает последние изменения, формируется «взрослая» микробиота, 60- 70% которой будет мало варьировать на протяжении всей жизни (Bergstrom et al., 2014).

В состав микробиома кишечника взрослых людей входят представители более 600 различных родов насчитывающих до 100 триллионов бактерий, которые являются благотворными для нашего метаболизма и здоровья (Clemente et al., 2012). Концентрации отдельных представителей в кишечной микробиоте не являются независимыми друг от друга- они связаны сетью симбиотических и антагонистических взаимодействий (Falony et al., 2016).

Согласно данным Национального института здоровья США (National Institutes of Health, NIH), только 10% клеток, входящих в состав человеческого организма, являются собственно человеческими клетками, а остальные 90% принадлежат бактериям, населяющим различные биотопы человека. Таким образом, homo sapiens является «суперорганизмом», в котором сосуществует большое количество различных организмов.

В 2008 году был запущен глобальный проект «Микробиом человека», ставивший своей целью расшифровку генома бактерий, населяющих организм человека. Расшифровкой генома бактерий, населяющих желудочно-кишечный тракт, занимается Европейский консорциум MetaHIT. Уже расшифровано около 3 млн генов, что примерно в 150 раз больше набора генов человека. Результаты проекта позволят попытаться установить взаимосвязь этих генов, состояния здоровья человека, развития заболеваний и фенотипа.

В 2010 году в исследование метагенома человека также активно включились российские ученые. По мнению журнала Science, расшифровка метагенома человека входит в число величайших научных открытий последнего десятилетия (Медицинский совет №16, 2016).

С нарушенной микробиотой кишечника ассоциируется широкий спектр заболеваний: инфекции, диарея, язвенная болезнь, рак желудка и рак толстой кишки, ожирение, мальабсорбция, сахарный диабет, пищевая аллергия, бронхиальная астма, воспалительные заболевания кишечника, кишечная колика, синдром раздраженного кишечника, поведенческие нарушения. Это обусловлено тем, что позитивная роль микробиоты состоит в обеспечении колонизационной резистентности ЖКТ, являющийся слагаемым антагонистической активности нормофлоры и защитных иммунных факторов, а также иммуномодулирующим, антимуtagenном и антиканцерогенном действии, участии в метаболических процессах, регуляции роста эпителиоцитов, защите слизистой оболочки от повреждений и регуляции местной толерантности (Парфенов и др., 2012).

Микробиота или нормальная микрофлора ЖКТ - один из наиболее многочисленных микробиоценозов, представленных разнообразными анаэробными и аэробными грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, наибольшее количество которых обнаруживается в толстой кишке человека. В настоящее время микробиоценоз ЖКТ изучен

на генетическом и молекулярном уровнях (Бондаренко, 2008). Выдающийся физиолог А.М. Уголев утверждал: «Микрофлора-обязательный компонент нормальной жизнедеятельности организма человека» (Клиническая медицина №1, 2013).

### **1.3. Образование и роль биопленки**

В нынешнее время общепринята модель биопленки, созданная на основе данных конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, согласно которой биопленки состоят из фрагментированных структур, образуемых микроколониями бактерий и экзополимерным матриксом, между которыми располагаются наполненные жидкостью каналы (Branda et al., 2005). Характерная особенность бактерий в биопленках - наличие мембранных пузырьков или везикул, в которых могут содержаться периплазматические гидролитические ферменты, транспортируемые к поверхности (Рыбальченко и др., 2006). Расшифрованы механизмы образования биопленок, учитывающие подвижность или неподвижность бактерий. У подвижных грамотрицательных бактерий, включая *E.coli*, на начальном этапе образования биопленки, доминирующая роль принадлежит жгутикам, с помощью которых бактерии достигают поверхности (Маянский и др., 2011). Далее после прикрепления к поверхности отдельных клеток и образования монослоя, наблюдается движение клеток по поверхности с формированием микроколоний и стимуляцией образования полисахаридного матрикса. Созревание биопленки сопровождается формированием ее трехмерной структуры (Vik et al., 2005).

#### 1.4. Нарушение микробиоты

Комментарий Европейского Общества Атеросклероза к статье от мая 2013 года в *New England Journal of Medicine* «Кишечные бактерии: экологический фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний», звучит следующим образом: «Хроническое воспаление, связанное с большинством болезней, которые убивают людей в развитых странах мира сегодня - заболевания сердца, рак, диабет- может начаться с неблагополучия кишечной микрофлоры» (Stock, 2013).

Микробиота является высокостабильной экосистемой в отсутствие серьезных внешних факторов. По мере старения человека стареет и его микрофлора. Недостаточное усвоение питательных веществ, связанное с возрастными физиологическими изменениями, может вести к нарушению состава микрофлоры. Снижение всасывания витамина В12, кальция, ионов железа, способствует развитию атрофического гастрита. Снижение моторики ведет к копростазу, запорам, увеличению времени прохождения кала по кишечному тракту, накоплению белков бактерий и их брожению (Каштанова, Бойцов и др., 2015). Дисбаланс между про- и противовоспалительными элементами у пожилых людей ведет к неспецифическому вялотекущему воспалению, называемого *inflammaging* (возрастное воспаление). Оно является основой развития онкологических, аутоиммунных, хронических неинфекционных заболеваний, болезни Альцгеймера, атеросклероза, остеоартрита, инсулинорезистентности, сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (Naq et al., 2014).

Возрастные изменения характеризуются количественным увеличением факультативных анаэробов и оппортунистических патогенов, повышение числа которых ассоциировано с неспецифическим воспалением. При этом уменьшается разнообразие микрофлоры, снижается продукция короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК),

секреция муцина, повышается проницаемость слизистой оболочки для патогенов (Tiihonen et al., 2008).

Результаты экспериментальных исследований и клинических наблюдений свидетельствуют о том, что микробиота кишечника и нарушение ее баланса могут играть роль и в развитии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). При изучении микробного профиля кишечника у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом выявили снижение уровня бифидо- и лактобактерий, увеличение количества микроорганизмов, продуцирующих сероводород, таких как *Fusobacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp* и др. Перечисленные микроорганизмы блокируют процесс окисления жирных кислот, приводя к энергодефициту в эпителиоцитах, стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, ингибируют фагоцитоз и лизис бактериальных клеток (Duncan et al., 1993). У больных, страдающих ВЗК, отмечается уменьшение содержания в кишечнике *Firmicutes* и *Bacteroides*, которые являются основными продуцентами КЦЖК, необходимых для формирования слизистого барьера, экспрессии плотных контактов (клаудина- 2), энергообеспечения колоноцитов и регуляции иммунного ответа (Krishnan et al., 1999).

Чаще при ВЗК в фекалиях выявляется инвазивная *E. coli*, стимулирующая выработку молекул адгезии. Способностью к адгезии и инвазии в большей степени отличаются патогенные микроорганизмы за счет наличия у них выростов нитевидной формы, расположенных на полюсах бактериальной клетки, облегчающих проникновение микроорганизмов в слизистые оболочки. Интегрины, обладающие свойством взаимодействовать с матриксными белками, такими как фибронектин и коллаген, облегчают «приклеивание» бактерий к клеткам-мишеням хозяина. У 42% больных с синдромом раздраженного кишечника наблюдалось усиление кишечной проницаемости и уменьшение экспрессии глутаминсинтетазы. Последняя катализирует превращение

аммиака и глутамата в глутамин, который служит основным источником энергии для быстро делящихся клеток слизистой оболочки кишечника. Истощение глутамина ведет к атрофии эпителия и последующему увеличению проницаемости эпителиального слоя (Poluektova et al., 2014).

Микробиота отделена от кишечной стенки анатомически и функционально, тем самым предотвращая бактериальное вторжение и воспалительные ответы. Несмотря на это, механизмы контроля, которые обеспечивают симбиотические отношения между хозяином и микробиотой, могут потерпеть неудачу при многих заболеваниях, таких как заболевание кишечника (Malou, Powrie, 2011). Микрофлора кишечника человека играет огромную роль в процессе возникновения развития КРР. Ассоциированные с микробным сообществом механизмы канцерогенеза включают генотоксическое действие бактериальных токсинов, таких как колибактин (Кутихин и др., 2012). Токсины способны продуцировать различные виды микроорганизмов. Так, колибактин, приводящий к онкогенным мутациям вследствие двухспиральных разрывов в ДНК, вырабатывают, кроме некоторых штаммов *E. coli*, также *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes* и *Citrobacter koseri* представители семейства *Enterobacteriaceae* (Putze et al., 2009).

Толстый кишечник является первичным сайтом канцерогенеза, содержащим микробную нагрузку  $10^{13}$ -  $10^{14}$ . Эта микробная экосистема находится в относительной близости к кишечному эпителию и выполняет важные функции в поддержании гомеостаза хозяина, такие как синтез основных витаминов, синтез различных питательных веществ из сложных углеводов, тонизация слизистой оболочки, а также экологическая конкуренция для предотвращения вторжения патогенных микробов (Hooper et al., 2001; Lozupone et al., 2012; Chiba et al., 2012).

### 1.5. Штамм *E. coli* NC101

По отношению к многоклеточным организмам более высокого порядка микробы уникальны в своей способности быстро развиваться с генетической адаптацией к условиям окружающей среды. Адаптация непатогенных комменсальных микробов, например, находящихся в просвете желудочно-кишечного тракта, происходит в ответ на физиологические условия хозяина (Sonnenburg et al., 2005). Преобладает гипотеза, что воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) являются результатом сочетания генетических и экологических факторов, которые предрасполагают к дизрегуляции иммунного ответа на условно-патогенные кишечные бактерии (Sartor, 2008).

Способность условно-патогенных энтеробактерий вызывать самые разнообразные поражения особенно примечательна, так как арсенал факторов патогенности в большинстве достаточно однообразен, таким образом форма инфекционной патологии зависит исключительно от уровня синтеза того или иного фактора. В свете последних достижений изучения генетического аппарата бактерий и особенно после обнаружения в них так называемых «геномных островов» - фрагментов чужеродной ДНК можно полагать, что значительная часть факторов вирулентности может передаваться посредством горизонтального переноса генов. В этом плане энтеробактерии не являются исключением, и в геномах многих из них имеются чужеродные «острова», где возможны совершенно неожиданные вариации генетического кода.

«Острова патогенности» - это кластеры генов, контролирующие патогенность их обладателей. Они представлены фрагментами ДНК размерами от 1 до 10 kb («островок») и от 10-20 до 200 kb («остров»). Эти «острова патогенности» обычно присутствуют у патогенных штаммов и отсутствуют у непатогенных изолятов. Данные локусы ДНК существенно отличаются от основной части генома по процентному содержанию

«гуанин+ цитозин». Как правило, они фланкированы малыми прямыми нуклеотидными повторами и ассоциированы с 3'- областью локусов транспортной РНК, являющийся местом интеграции генов патогенности, входящих в состав геномов профагов, плазмид и транспозонов. Исторически эволюция «островов патогенности» включает селекцию, делецию и перераспределение отдельных генов. Стабильность их достаточно вариабельна, так как они могут входить в состав бактериофагов, плазмид и транспозонов (Мавзютов, Фиалкина, Бондаренко, 2002; Поздеев, 2010).

Обширный массив данных свидетельствует о способности адгезивно- инвазивных штаммов *E. coli* колонизировать слизистую оболочку толстого кишечника больных колоректальным раком (Swidsinski et al., 1998; Raisch et al., 2014). Некоторые комменсальные *E. coli*, которые придерживаются и вторгаются в эпителиальные клетки, были вовлечены в развитие илеальной болезни Крона (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Кроме того, показано, что у 48% больных колоректальным раком численность условно- патогенной микрофлоры повышена (Нгуен и др., 2016). Хроническое воспаление признано важным фактором риска для многих форм рака, включая КРР (Elinav et al., 2013). Важно отметить, что ВЗК, связано с большим содержанием *Enterobacteriaceae* / *E.coli* в кишечной микробиоте (Morgan et al., 2012). Несколько исследований выявили, что определенные штаммы *E.coli*, обладающие кластером генов, названные островов *pks+*, могут быть прямой причиной развития КРР (Arthur et al., 2012; Вuc et al., 2013).

*E. coli* - грамотрицательный, факультативный анаэроб, представитель семейства *Enterobacteriaceae*. Этот вид подразделяется на восемь филогенетических линий: А, В1, В2, С, D, Е, F и KI (Clermont, et al, 2013). Почти все *E. coli* относятся к филогруппам А, В1, В2 и D и классические экстра-кишечные патогенные штаммы *E.coli* (ExPEC) относятся к группе В2 (Escobar-Paramo et al, 2014). Интересно, что остров *pks* сильно связан с

штаммами *E. coli* филогенетической группы B2 (Raisch et al, 2014). Штаммы, выделенные в странах с западным жизненным стилем, относятся в основном к группе B2, и их распространенность постоянно увеличивается (Tenailon et al, 2010).

Таким образом, есть мнение, что в будущем также возрастет распространенность *pks* *E. coli*. Интересно, что остров *pks* часто ассоциируется с другими факторами вирулентности, такими как другие цикломодулины, адгезины или гены вирулентности, связанные с ExPEC (адгезины, гемолизины, токсины, сидерофоры) (Friswell et al, 2014). Таким образом, кажется, что остров *pks* связан с особенно высокой вирулентной подгруппой B2-штаммов.

### **1.6. Колибактин - новый бактериальный токсин**

Цикломодулины - это бактериальные токсины, которые препятствуют клеточному циклу эукариотических клеток. В 2006 году был обнаружен новый цикломодулин, называемый колибактином, который синтезируется геномным островком *pks*. Несмотря на многочисленные усилия, колибактин еще не очищен, и его структура остается неуловимой. Интересно, что остров *pks* встречается у членов семейства *Enterobacteriaceae* (главным образом *E.coli* и *Klebsiella pneumoniae*), выделенных из разных источников, в том числе из кишечной микробиоты, при септицемии, при менингите новорожденных и инфекциях мочевыводящих путей. Колибактин - продуцирующие бактерии индуцируют хромосомную нестабильность и повреждение ДНК в эукариотических клетках, что приводит к старению эпителиальных клеток и апоптозу иммунных клеток. Остров *pks* в основном наблюдается в штаммах *E. coli* филогруппы B2, которые включают экстра-кишечные патогенные штаммы *E. coli*, и *pks+* *E. coli* чрезмерно представленные в биопсии, выделенные из колоректального рака. Кроме того, бактерии

*pks+E. coli* увеличивают количество опухолей в различных моделях мышей с колоректальным раком.

До 2006 года в *E.coli* были известны три типа цикломодулинов: два способных ингибировать пролиферацию (цитолептический дистилляционный токсин, CDT и фактор ингибирования цикла, Cif) и один способный стимулировать пролиферацию (цитотоксический некротический фактор, CNF) (Nougayrede et al., 2005). В 2006 году Nougayrede и его коллеги идентифицировали в штамме IHE3034 менингита *E. coli* токсин, который они назвали колибактином.

Колибактин представляет собой природное и генотоксическое химическое соединение, которое синтезируется поликетидсинтазами, не рибосомальными пептидсинтазами и гибридными ферментами, кодируемыми геномным островком на 54 килобайта, обозначенным как *pks* (Nougayrede, Homburg, 2006). Этот токсин индуцирует двухцепочечное разрушение ДНК, хромосомные aberrации и остановку клеточного цикла в фазе G2 / M (Cuevas-Ramos, Petit, et al., 2010). Интересно отметить, что *pks*-укрывающие кишечные палочки, были выделены не только из кишечной микробиоты в виде комменсальных бактерий (Payros, Secher, Boury, 2014), но и при инфекционных заболеваниях, таких как сепсис (Micenkova, Benova, et al, 2017), менингит новорожденных (McCarthy, Martin, et al, 2015) и инфекциях мочевых путей (Krieger et al., 2011). Кроме того, продуцирующие колибактин *E. coli* являются чрезмерно представленными при колоректальном раке (Zingmark, Edin, et al, 2017) и они увеличивают количество опухолей в различных моделях мышей с КРР (Tomkovich, Yang, et al, 2017). Таким образом, этот токсин может оказать значительное влияние на здоровье человека.

Известно, что *pks*-родственные острова производят многочисленные соединения (Fischbach et al., 2006). Следовательно, исследования, отличные от генотоксичности, были проведены. Биологические исследования ясно показали, что бактерии, продуцирующие колибактин,

обладают противовоспалительным (Olier et al., 2012) и анальгетическими эффектами (Pujo, Martin, et al, 2017). Таким образом, вместо того, чтобы производить одно соединение, остров *pks*, вероятно, производит несколько, и в этом случае было бы интересно очистить их, чтобы исследовать их биоактивность. Однако, несмотря на многие усилия, структура этих соединений по-прежнему остается частично неуловимой.

Как было сказано ранее, остров *pks* первоначально был идентифицирован в штамме HNE3034 *E. coli*, выделенном из неонатального бактериального менингита (Homburg et al, 2006). Эпидемиологические исследования показали, что *pks* также можно встретить у видов *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и *Citrobacter koseri*.

*E. coli*, которые содержат *pks*, являются относительно частыми и могут быть выделены из множества локусов человеческого тела. Независимые исследования сообщили о наличии *pks E. coli* в кишечной микробиоте с преобладанием в стуле от 12 до 32% (Putze et al, 2009). Исследование, проведенное на 130 шведских новорожденных, показало, что в фекалиях 33% протестированных *E. coli* носили остров *pks* (Nowrouzian et al, 2012). Эти результаты были подтверждены исследованием, проведенным во Франции у 184 здоровых новорожденных, у которых 26,9% *E.coli*, выделенных из образцов фекалий, были положительными на *pks* (Payros et al, 2014). *E. coli* является одной из основных причин инфекций мочевых путей (Flores-Mireles, et al, 2015). Dubois et al. скринировали 146 штаммов уропатогенных *E. coli* и обнаружили, что 32% из них были положительными для *pks*. Другое исследование, включающее 18 штаммов *E.coli*, ответственных за простатит, показало, что 72% укрывали *pks* (Krieger, et al, 2011). *E. coli* штаммы, экспрессирующие капсулу K1, являются основной причиной сепсиса и менингита новорожденных. Сообщается также, что остров *pks* сильно связан с *E. coli* K1: из 34 изолятов, исследованных, *pks* было найдено в 33 (McCarthy, Martin et al, 2015). Наконец, 31,5-58% кишечной

палочки, обнаруженной в культурах крови, также испытывали положительный результат для *pks* (Johnson, et al, 2008; Micenkova, Benova, et al, 2017).

### 1.7. Колибактин и колоректальный рак

Поскольку *pks E. coli* часто встречаются в кишечной микробиоте (Dubois et al., 2010), а изменения ДНК связаны с раковыми заболеваниями, были проведены многочисленные исследования, чтобы понять потенциальную роль этих бактерий при КРР.

Большинство КРР (~ 90%) являются спорадическими и поэтому подвержены влиянию внешних факторов, таких как диета и микробиота (Lucas et al., 2017). *E. coli* подозревается в участии в развитии КРР. Уже почти 20 лет известно, что биопсия человека, страдающего КРР, сильно колонизирована *E. coli* (Swidsinski et al., 1998). Более тщательное наблюдение этих бактерий показывает, что они способны продуцировать несколько цикломодулинов и, в частности, колибактин как было сказано ранее. Результаты показали, что колибактин-продуцирующая *E. coli* обнаружена у 55-67% пациентов с колоректальным раком, но менее чем у 20% контролей (Arthur et al., 2012). Пациенты с семейным аденоматозным полипозом (FAP) развивают доброкачественные поражения предшественников (полипы) на ранней стадии жизни из-за мутаций зародышевой линии в геноме супрессора опухоли APC (аденоматозный полипозный колит) (Kinzler et al., 1991). Сообщалось, что слизистая оболочка пациентов с FAP достоверно ассоциировалась с *pks E. coli* (68%) по сравнению с здоровой слизистой оболочкой (22%) (Dejea et al., 2018). Все эти исследования были проведены в Европе (Великобритания (Roberts et al., 2014), Франции и Швеции (Eklof et al., 2017) и в США (Dejea et al., 2018). На сегодняшний день только одно исследование, проведенное в Японии, не сообщило о какой-либо разнице в распространенности положительных генов *pks*, обнаруженных в фекалиях пациентов с КРР и

здоровом контроле (Shimproh, Hirata et al., 2017). В этом исследовании 43% пациентов с CRC были положительными для *pks* (что согласуется с предыдущими отчетами). Напротив, 46% контролей были положительными для *pks*, что намного выше, чем распространенность, о которой сообщалось в предыдущих исследованиях. Состав микробиоты зависит от рассмотренного географического района, это может объяснить, почему распределение острова *pks* в японском образце отличается от распределения в Европе и США (Lozupone et al., 2012).

Недавно в разработке CRC была предложена модель бактериального водителя и пассажира (Tjalsma et al., 2012). В этой модели некоторые бактерии, называемые «бактериальные водители» инициировали бы КРР, тем самым изменяя кишечную нишу, которая благоприятствует распространению оппортунистических бактерий, называемых «бактериальными пассажирами». Текущие экспериментальные данные на животных предполагают, что *pks E. coli* неспособны спонтанно индуцировать КРР (Payros et al., 2014). Однако у мышей, предрасположенных к КРР, одни и те же бактерии увеличивают тяжесть заболевания (Tomkovich et al., 2017). Это потенциально предполагает, что у них есть пассажирская роль, но, учитывая пагубное влияние на ДНК, вызванное колибактином, роль водителя также возможна. Чтобы вызвать повреждение ДНК и играть роль водителя, бактерии содержащие *pks* должны находиться в тесном контакте с стволовыми клетками кишечника (Nougauryde et al., 2006) и подвергаться воздействию благоприятных условий окружающей среды (для получения колибактина). Таким образом, хотя у японских пациентов была высокая перевозка *pks E. coli*, но до тех пор, пока они не подверглись специфическим условиям, необходимым для производства колибактина и для контакта между бактериями и эпителиальными клетками, *pks E. coli* не оказывало вредного воздействия на эпителиальные клетки кишечника.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Лабораторное обследование больных**

В соответствии с поставленной целью исследования клинико-лабораторный отбор больных проводился из числа госпитализированных в ГБУЗ РБ «Инфекционная клиническая больница № 4» в 2018 году. Клинические образцы были собраны у 54 пациентов, страдающих среднетяжелыми формами острой кишечной инфекции. Основными симптомами являлись слабость, вялость, боли и неприятные ощущения в области мезогастрия, диспепсия, чаще жидкий стул.

Так же отбор образцов проводился из числа госпитализированных в ГБУЗ РБ «Городская клиническая больница № 21» в 2017 с диагнозами неспецифический язвенный колит (НЯК) и болезнь Крона (БК). Пациенты жаловались на боль в нижней части живота, вздутие, стул с кровью и слизью, потеря веса. Образцы были предоставлены в парафиновых блоках.

### **2.2. Выделение ДНК бактерий из кала**

Подготовка проб из образцов кала:

1. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок по типу эппендорф объемом 1,5 мл.
2. Далее промаркировать пробирки.
3. Добавить по 1000 мкл 0,9% физиологического раствора натрия хлорида.
4. Затем внести в пробирки кал по 1 грамму, жидкий- по 200 мкл.
5. После тщательно ресуспендировать на вортексе и центрифугировать 15 мин при 12 тыс об/мин.

Тотальную бактериальную ДНК из кала выделяли используя стандартный комплект реагентов для выделения ДНК из клинического

материала «ДНК- сорб- В» (АмплиСенс» г. Москва). Принцип метода основан на том, что исследуемый образец обрабатывается лизирующим раствором. В результате происходит деструкция клеточных мембран, биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. К лизирующему образцу добавляли сорбент. Далее растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и его последующей отмывке. При добавлении буфера для элюции к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Методика выделения ДНК:

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 необходимо прогреть до полного растворения кристаллов при температуре 65<sup>0</sup>С.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл по типу Eppendorf, включая отрицательный контроль.
3. Внести в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора и по 100 мкл пробы, используя индивидуальные наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести по 100 мкл ОК.
4. Пробы тщательно перемешиваем на вортексе и прогреваем 5 минут при температуре 65<sup>0</sup>С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс. об/минуту на микроцентрифуге, при этом проба должна раствориться полностью.
5. Тщательно ресуспендируем сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляем 25 мкл сорбента

универсального. Перемешиваем на вортексе, помещаем в штатив на 2 минуты, еще раз перемешиваем и оставляем в штативе на 5 минут.

6. Осаждаем центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с сорбент универсальный. Удаляем надосадочную жидкость при помощи вакуумного аспиратора используя при этом отдельные наконечники для каждой пробы.

7. Добавляем в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осаждаем сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удаляем надосадочную жидкость по известной методике.

8. Добавляем в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешиваем на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, после центрифугируем 30 с при 10 тыс об/мин. Удаляем надосадочную жидкость. Эту процедуру повторяем еще раз.

9. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре  $65^{\circ}\text{C}$  на 5- 10 мин для подсушивания сорбента универсального.

10. В пробирки добавить по 50 мкл ТЕ- буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре  $65^{\circ}\text{C}$  на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

11. Процентрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от  $2$  до  $8^{\circ}\text{C}$ , и в течение года при температуре не выше минус  $16^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. Депарафинизация и оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин**

Этот способ основан на быстром лизисе тканей, избавлении от парафина и осаждении ДНК этанолом. Преимуществами данного метода являются отсутствие органических растворителей и в несколько раз более низкая стоимость (Писарева и др., 2015).

Общая схема состоит из трех этапов:

- 1) Лизис ТПФ в растворе щелочи в присутствии детергента в течение 30 мин при температуре 95°C;
- 2) Депарафинизация методом вымораживания;
- 3) Осаждение ДНК этанолом.

Заранее подготовили 3 М раствор ацетата натрия. Для этого взвесили 20,4 г  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и доводили дистиллированной водой до 50 мл.

На этапе лизиса готовили срезы толщиной 5 мкм, помещали их в 1,5-миллилитровые пробирки типа эппендорф по 4 среза и лизировали ткань в 200 мкл раствора 0,1 М NaOH - 0,5 % SDS при 95°C в течение 30 мин. Затем нейтрализовали смесь добавлением 3 М ацетата натрия с pH=5,0 до конечной концентрации 0,3 М.

Для депарафинизации вымораживанием образцы после лизиса охлаждали 5 минут при температуре -20°C для застывания парафина. Жидкий лизат из-под слоя застывшего парафина переносили в новую пробирку и использовали для последующего выделения ДНК.

ДНК очищали спиртовым осаждением, для этого к раствору ДНК после лизиса добавляли два объема изопропанола, центрифугировали 2 мин при 5 тыс. об/мин для осаждения остатков парафина. Супернатант переносили в новую пробирку и осаждали ДНК центрифугированием 5 мин при 10 тыс. об/мин. Далее изопропанол удаляли фильтровальной бумагой со стенок пробирки, а осадок промывали 1 мл 96% этанола и растворяли в 100 мкл дистиллированной воды.

## 2.4. Выбор праймеров для исследования

Для молекулярно - генетической идентификации островков генотоксичности *pks* использовали известные праймеры из статьи Eaton K. с соавт. (2015). Для детекции *pks* в статье предложены две пары праймеров к 3'-концу и 5'-концу «островка» генотоксичности.

Таблица 1. Пары праймеров, использованная в работе, и их характеристика (Eaton et. al., 2015)

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
L1	5'-AAT CAA CCC AGC TGC AAA TC-3'	56°C	1824
L2	5'-CAC CCC CAT CAT TAA AAA CG-3'		
R1	5'-AGC CGT ATC CTG CTC AAA AC-3'	56°C	1413
R2	5'-TCG GTA TGT CCG GTT AAA GC-3'		

Кроме того, для контроля выделения ДНК из клинического материала были использованы праймеры на наличие б-актина – глобулярного белка человека (табл.2).

Таблица 2. Праймеры на наличие б-актина в образцах клинического материала, и их характеристика

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
GAPDH F	5' – TCAAGACCTTGGGCTGGGACTGG -3'	63°C	158
GAPDH R	5'– ACGCAAAAGAAGATGCGGCTGACTGT -3'		

## **2.5. Амплификация участков ДНК методом полимеразной цепной реакции**

В основе метода ПЦР (полимеразной цепной реакции) лежит возможность ферментов, таких как ДНК-полимераза, осуществлять направленный синтез соответствующей (комплементарной) цепи ДНК, по данной матрице одноцепочечной ДНК, наращивая маленькую олигонуклеотидную затравку (праймер), комплементарную участку этой матрицы, до размеров в несколько тысяч или даже десятков тысяч звеньев. Каждый цикл ПЦР состоит включает в себя три этапа. На первом этапе происходит денатурация ДНК, имеющаяся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95°C, в следствие этого двухцепочечные молекулы ДНК раздваиваются на одноцепочечные молекулы. На втором этапе происходит отжиг (присоединение праймеров к ДНК-мишени с образованием коротких двухцепочечных участков ДНК, необходимых для инициации синтеза ДНК). С вновь образованными комплексами праймер и матрица связывается ДНК-полимераза и на третьем этапе происходит одновременное копирование ДНК с двух праймеров комплементарных участкам ДНК на противоположных цепях и расположенных таким образом, что полимеризация ДНК с одного праймера приводила к синтезу цепи ДНК, в которой на определенном удалении содержался участок ДНК, комплементарный другому праймеру. Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами, начинают накапливаться после третьего цикла. Образованные в первом цикле цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование нужного специфического фрагмента ДНК генома вируса, бактерий или человека. Далее в амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза последующих цепей.

Основные компоненты реакционной среды:

1. ДНК-матрица - выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая искомый специфический фрагмент.

2. Праймеры (Forward и Reverse) - синтетические олигонуклеотиды размером 15-30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям определяемого фрагмента и ограничивающие его; играют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность и специфичность реакции. Для ПЦР используют 2 праймера, которые ограничивают с двух сторон последовательность.

3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

4. Таq-полимераза - термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК.

5. Буферный раствор - реакционная среда, содержащая различные ионы, в том числе ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента.

Аmplификацию участков ДНК осуществляют с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2».

Можно использовать одновременно несколько пар родоспецифичных праймеров в одной реакционной смеси для одновременной амплификации ДНК различных микроорганизмов. Такая модификация называется множественной ПЦР (multiplex PCR). Множественная ПЦР может быть использована для выявления этиологической роли различных микроорганизмов, вызывающих заболевания определенного типа.

Ход работы:

1. Располагаем в штативе буфер Таq-полимеразы, дНТФ, растворы праймеров для разморозки, после ресуспендируем на вортексе. Таq-полимеразу хранят в холодильнике.

2. Отбираем нужное количество одноразовых пробирок объемом 0.6 мл, маркируем и расставляем в штатив.

3. Готовим амплификационную смесь для анализируемых проб в пробирке на 1.5 мл и разливаем по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0.6 мл.

4. В каждую пробирку вносим по 3 мкл ДНК исследуемого образца.

5. На поверхность каждой реакционной смеси наносим 1 каплю минерального масла во избежание испарения жидкости.

6. Пробирки закрываем, центрифугируем 5 с при 3000 об/мин на микроцентрифуге-вортекс.

7. Переносим пробирки в амплификатор.

8. На ДНК амплификаторе запускаем программу.

9. Проводим амплификацию на термоциклере «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия).

Этапы проведения амплификации.

Для получения достаточного для визуализации количества копий целевого фрагмента ДНК необходимо провести 20-40 циклов амплификации, каждый цикл включает в себя несколько стадий:

Инициация - необходима в случае, если активация ДНК-полимеразы происходит с помощью нагревания при высоких температурах, реакционную смесь выдерживают при 93-96°C в течение нескольких минут.

Этап 1. Денатурация - реакционную смесь нагревают при 93-95°C в течение 30-40 сек., происходит расплетение двойной спирали ДНК с образованием одноцепочечных молекул.

Этап 2. Отжиг праймеров - происходит комплементарное связывание праймеров с ДНК-матрицей, температура отжига специфична для каждой пары праймеров и ее значения располагаются в интервале 50-65° С, реакция протекает в течение 10-40 сек.

Этап 3. Элонгация цепи - происходит синтез новых цепей ДНК Taq-полимеразой путем удлинения праймеров в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°C, время проведения элонгации зависит от размера амплифицируемого фрагмента.

Образовавшиеся в ходе первого цикла амплификации новые молекулы ДНК служат матрицей для второго цикла репликации ДНК, таким образом, происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается около 10<sup>8</sup> молекул ампликона. Такого количества достаточно для визуального обнаружения ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

Программа амплификации:

1. Начальная денатурация 95°C – 5 мин
  2. Денатурация – 95°C – 40 сек
  3. Отжиг – 56°C – 45 сек
  4. Элонгация – 72°C – 45 сек
  5. Хранение- 4°C
- 
- 30 циклов

Качество и количество амплифицированных фрагментов ДНК определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США).

## 2.6. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Добавляли рассчитанное количество порошка агарозы (1 грамм) в отмеренный объем э/ф буфера (2мл 50x TAE буфера и 100мл очищенной воды). Нагревали смесь в микроволновой печи до полного расплавления геля (1,5-2 мин). Раствор остужали до 50°C. В заливочную камеру помещали чистую стеклянную пластинку. На одном из краев камеры установили пластиковый гребешок так, что его зубцы образовали в геле лунки для проб ДНК. Необходимо, чтобы между концом зубчиков и стеклянной пластинкой оставался зазор 0,3-0,5 см. Аккуратно заливали в форму теплый раствор агарозы толщиной не более 5-6-мм. Предварительно развели 1 л 1-кратного буфера TAE. После полного застывания агарозы (15-20 мин) аккуратно вынимали гребенку, стараясь не повредить образовавшиеся кармашки. Отбирали 7 мкл раствора ДНК из эппендорфа, избегая попадания минерального масла в наконечник, на пластинку для нанесения проб. Добавляли 3 мкл красителя бромфенолового синего с ксиленцианолом и глицерином. Перемешивали пипеткой. Медленно наносили автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля. Пластинку с гелем из камеры помещали в электрофоретическую камеру. Заливали в камеру буфер так, чтобы он покрыл агарозу сверху тонким слоем 2-3 мм.

Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише. Включали источник питания и устанавливали напряжение в 100 вольт. Проводили разобшение ДНК в течение 30 мин. Вынимали пластинку с гелем и помещали ее в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивали в течение 7-10 мин. Сливали краситель в колбу. Промывали гель под проточной водой. Аккуратно помещали его на стекло трансиллюминатора. Фотографировали гель на фотосистеме Gel Camera System (UVP, Inc. США).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Проверка выделенной ДНК из биоптатов

Освидетельствование выделения ДНК после демаскировки проводили с праймерами на факт присутствия в клиническом материале  $\beta$ -актина (глобулярного белка человека) (рис.1). В результате выделение ДНК из ТФП, описанная Писаревой с соавт. (2015), оказалась эффективной, так как во всех образцах результат был положительным.

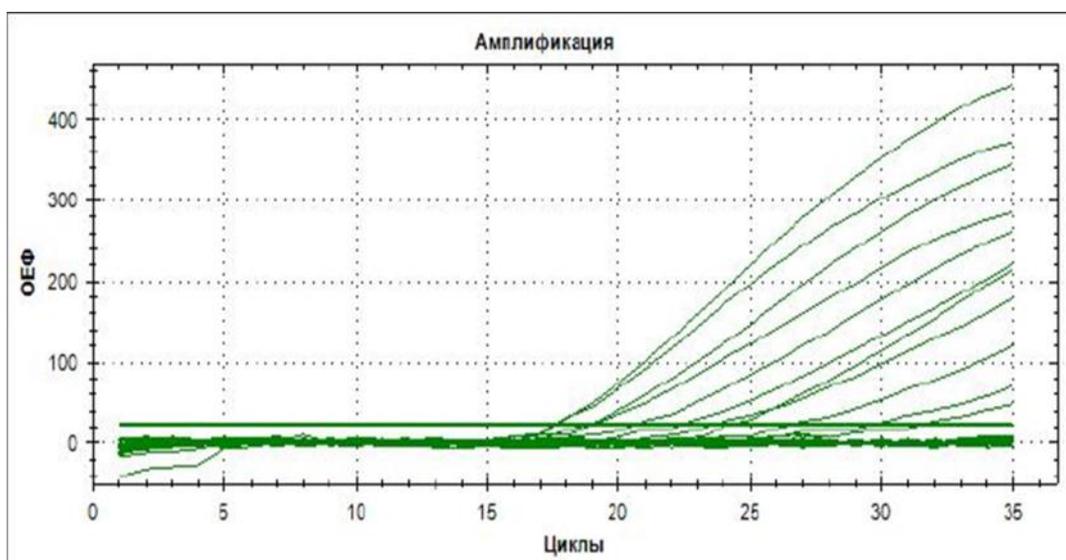


Рисунок 1 – Результаты ПЦР RealTime на присутствие  $\beta$ -актина в экстрагированных образцах.

Таким образом, до постановки ПЦР с родоспецифичными праймерами была проведена проверка выделенной ДНК в клинических образцах. После подтверждения наличия ДНК в образцах проводили амплификацию методом классической ПЦР.

### 3.2. Выбор праймеров к островкам патогенности *pks*

Для молекулярно - генетической идентификации островков генотоксичности использовали известные праймеры из статьи Eaton К. с соавт. (2015) (рис.2).



REGISTERED REPORT



#### Registered report: Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota

Kate Eaton<sup>1</sup>, Wanwan Yang<sup>2</sup>, Reproducibility Project: Cancer Biology\*\*

<sup>1</sup>Germ Free Laboratory, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, United States; <sup>2</sup>ImpeDx Diagnostics Inc., Kansas City, United States

**REPRODUCIBILITY  
PROJECT  
CANCER BIOLOGY**

**Abstract** The Reproducibility Project: Cancer Biology seeks to address growing concerns about reproducibility in scientific research by conducting replications of 50 papers in the field of cancer biology published between 2010 and 2012. This Registered report describes the proposed replication plan of key experiments from 'Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota' by Arthur *et al.* (2012), published in Science in 2012. Arthur and colleagues identified a genotoxic island in *Escherichia coli* NC101 that appeared to be

Primer	Sequence	Expected band size	Comment
L1	5'-AAT CAA CCC AGC TGC AAA TC-3'	1824 bp	L1 + L2 detect the 3' end of the <i>pks</i>
L2	5'-CAC CCC CAT CAT TAA AAA CG-3'		
R1	5'-AGC CGT ATC CTG CTC AAA AC-3'	1413 bp	R1 + R2 detect the 5' end of the <i>pks</i>
R2	5'-TCG GTA TGT CCG GTT AAA GC-3'		

Рисунок 2 – Фрагмент статьи Eaton К. с соавт. (2015)

### 3.3. Детекция «острова» патогенности *pks* в образцах кала

Методом ПЦР были исследованы клинические образцы пациентов с патологией ЖКТ с праймерами на наличие «островов» генотоксичности *pks*, кодирующий мультиферментативный механизм, производящий генотоксическое вещество- колибактин (рис.3). Для ПЦР-анализа использовали две пары праймеров L1 и L2 (к 3'-концу гена *pks*) и R1 и R2 (к 5'-концу гена *pks*). Обе пары показали одинаковый результат.

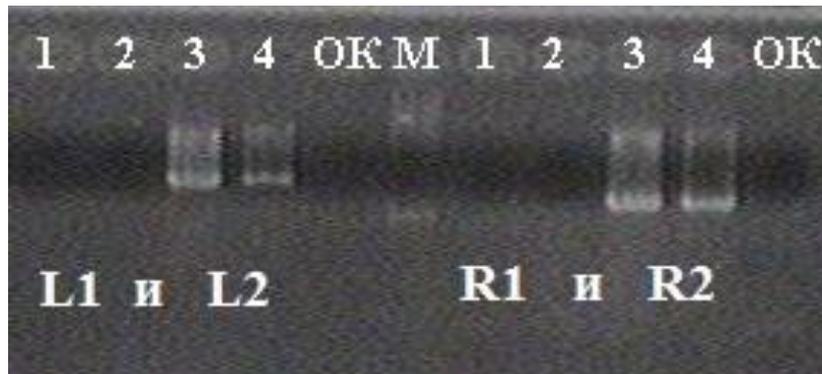


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК на наличие фрагмента гена *pks* с праймерами L1 и L2 и R1 и R2: 1-4 – ДНК, выделенная из кала; ОК - отрицательный контроль; М - маркерная лестница

В результате фрагменты гена *pks* были обнаружены у 7 пациентов из 54, что составляет 13% случаев (рис.4).

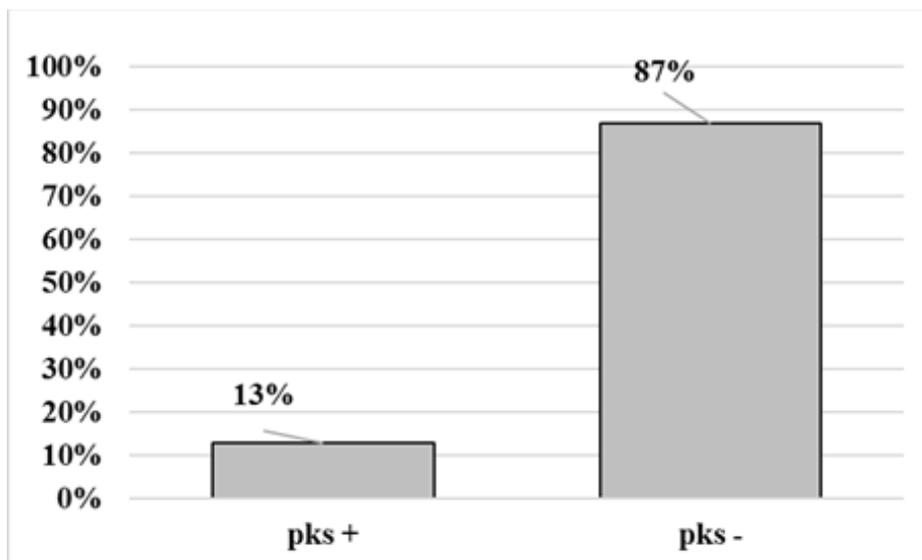


Рисунок 4 – Частота встречаемости фрагмента *pks* у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

При этом в исследуемой группе пациентов с патологиями ЖКТ встречались диагнозы дисбактериоз, язвенный колит, острые кишечные инфекции (ОКИ), ВЛ слепой кишки. В результате было выявлено, что фрагмент гена «островка» патогенности *pks* обнаруживается только в

клинических образцах, взятых у пациентов с диагнозом дисбактериоз. Это может говорить о более тяжелом течении заболевания у таких пациентов.

При обнаружении фрагмента гена «островка» патогенности *pks* в клиническом образце пациентам необходима серьезная терапия, так как при сочетании различных инфекций с *E. coli* могут развиваться воспалительные поражения, что вводит пациентов в зону риска развития рака толстой кишки.

### 3.4. Детекция «острова» патогенности *pks* в биоптатах при воспалительных заболеваниях

Исследованию подверглись пробы биоптатов толстого кишечника от разных пациентов, поступивших в лечебное учреждение с диагнозом неспецифический язвенный колит и болезнь Крона в количестве 40 экземпляров. В данном случае *pks* - позитивные образцы обнаружены не были (рис.5).

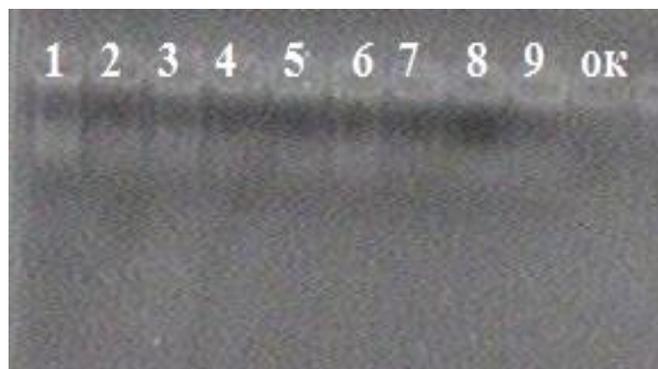


Рисунок 5 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК на наличие фрагмента гена *pks* с праймерами L1 и L2: 1-9 – ДНК, выделенная из биоптатов; ОК - отрицательный контроль

Такие данные могут говорить о том, что *E. coli*, несущие ген «островов» генотоксичности *pks*, не обладают высокой инвазивностью по отношению к энтероцитам и колоноцитам и вследствие этого наибольшая

концентрация бактерий находится именно в кале, а их концентрация в биоптатах очень низкая.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с нарастающей скоростью распространения онкологии в разных возрастных группах и множества факторов предрасполагающих к его развитию, а именно условно-патогенных микроорганизмов с их способностью передавать друг другу информацию, целью выполненной работы явилась оценка роли вариантов *E coli* NC 101, несущих острова *pks* в этиологии воспалительных заболеваний кишечника, приводящие к онкопатологии.

В ходе исследования выявили частоту встречаемости гена «острова» патогенности *pks*, в разных клинических образцах, а именно в кале и в биоптатах толстого кишечника при различных патологиях ЖКТ. Клинические образцы кала отразили наличие гена *pks* в 13% случаев, а при исследовании биоптатов результаты оказались отрицательными во всех 40 пробах.

Для более ранней диагностики онкологических заболеваний ЖКТ, а также осложнений связанных с ним, целесообразно проводить исследование кала на наличие «островов» патогенности *pks*, что является неинвазивной процедурой для пациентов входящих в группу риска.

## ВЫВОДЫ

1. Для проведения исследований выделена ДНК из биоптатов кишечника и кала у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.
2. Выбраны и проверены праймеры для детекции островков генотоксичности *pks*.
3. При проведении ПЦР-анализа обнаружено наличие гена *pks* в кале у 13% исследуемых пациентов с диагнозами дисбактериоз, острые кишечные инфекции, язвенный колит, VL слепой кишки, что говорит о более тяжелом течении данных состояний.
4. В образцах биоптатов от пациентов с клиническими диагнозами неспецифический язвенный колит и болезнь Крона, все результаты были отрицательными, что может говорить о неинформативности клинического материала в данном случае, либо о присутствии другого фактора развития этих заболеваний, кроме *pks*.
5. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, лабораторной диагностике, в практическом здравоохранении для выявления роли гена острова генотоксичности *pks* в развитии добро- и злокачественных новообразований в желудочно- кишечном тракте.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико- лабораторный синдром: современное состояние проблемы. // ГЭОТАР- медиа.- 2007.-С. 308.
2. Варичев А.Н., Соловьева И.В., Гелашвили Д.Б. Ранговые распределения численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп. // Вестник Нижегородского университета им.Н.И.Лобачевского. – 2012.– Т.2, №3.– С. 34-40.
3. Григорьева Г.А. Язвенный колит и болезнь Крона – проблема ххi века. // Вестник Смоленской медицинской академии.- 2011.- № 1.- С. 14-15.
4. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джioев Ю.П., Долгих В.В., Ракова Е.Б., Бухарова Е.В. Детекция некоторых генов, кодирующих факторы патогенности у типичных изолятов *Escherichia coli*. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2014. – Т.5, №99.- С. 89-94.
5. Каприн А. Д, Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 г. (заболеваемость и смертность). // под ред.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России,- 2015.- С. 250 с.
6. Каштанова Д.А., Бойцов С.А. Ткачева О.Н. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 3. Липидный профиль, углеводный обмен и микробиота кишечника. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. // Журнал Микробиологии.- 2015.- № 14(6).- С. 83- 86.
7. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 1. Микробиота кишечника, возраст и пол. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. // Журнал Микробиологии. - 2016.- № 14(4).- С. 92- 95.

8. Кутихин А.Г., Брусина, Е.Б., Попова Ю.А., Южалин А.Е., Животовский А.С., Брико Н.И. Связь микрофлоры толстого кишечника с возникновением колоректального рака. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.- 2012.-№ 4.- С. 44- 52.

9. Кучумова С.Ю., Полуэктова Е.А., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.- 2011; № 21(5).- С. 17-27.

10. Мавзютов А.Р., Фиалкина С.В., Бондаренко В.М. “Острова” патогенности условно- патогенных энтеробактерий. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2002.- № 6.- С.5-9.

11. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. и др. Межвидовое взаимодействие бактерий и образование смешанной (полимикробной) биопленки. // Журнал микробиологии.- 2011.- №1.- С. 93-101.

12. Нгуен Н.Т., Вафин Р.Р., Ржанова И.В.1, Колпаков А.И., Гатауллин И.Г., Тюлькин С.В., Синягина М.Н., Григорьева Т.В., Ильинская О.Н. Молекулярно-генетический анализ микроорганизмов с внутриэпителиальной инвазией, выделенных от больных колоректальным раком. // Экспериментальные статьи.- 2016.

13. Огнерубов Н.А, Иванников А.А, Милованов В.В., Чанг В.Л. // Вестник ТГУ.- 2015.- т.20, вып. № 6.

14. Писарева Е.Е., Любченко Л.Н., Коваленко С.П., Шаманин В.А. Оптимизация метода выделения ДНК из ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин. // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2015.

15. Поздеев О.К. Молекулярно-генетические основы патогенности энтеробактерий. // Практическая медицина.- 2010.- № 2.- С. 84- 88.

16. Рыбальченко О.В., Добрица В.П. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. // Вестник СПбГУ.- 2008.- С. 102.

17. Alfredo G.T., Vazquez-Juarez R.C., Christopher B.T., Garcia-Gallegos J.G. Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. // *Infection and immunity*.- 2005.- Vol. 73, № 8.- P.4766-4776.

18. Arthur J.C., Perez-Chanona E., Muhlbauer M., Tomkovich S., Uronis J.M., Fan T.J., Campbell B.J., Abujamel T., Dogan B., Rogers A.B. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. // *Science*.- 2012.- Vol. 338.- P. 120–123. DOI: 10.1126/science.1224820.

19. Arthur J.C. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. // *Science*.- 2012.- Vol. 338(6103).- P.120-3.

20. Bergstrom K.S., Kisson-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Ryz N., Huang T., Velcich A., Finlay B.B. et al. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. // *PLoS Pathog*.- 2014.

21. Boardman L.A., Morlan B.W., Rabe K.G. et al. Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives? // *Clin. Gastroenterol. Hepatol*.- 2007.- Vol. 5 (10).- P. 1195- 1198.

22. Bondarenko V.M., Mavziutov A.R. Types of secretion and regulation of the functional activity of molecules associated with the pathogenicity of *Enterobacteriaceae*. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*.- 2002.- № 5.- С. 86-91.

23. Bondarenko V.M., Mavziutov A.R., Agapova O.V. Serine proteases of gram-negative bacteria: structure, mechanisms of secretion, biological activity. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*.- 2002.- № 6.- С. 80-85.

24. Bondarenko V.M., Mavziutov A.R., Gabidullin Z.G. Thermostable enterotoxins of opportunistic pathogenic representatives of *Enterobacteriaceae*. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*.- 1998.- № 3.- С.104-107.

25. Bouguenes C.L., Servin A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/ Dr adhesins (Afa/ Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. // *FEMS Microbiology Letters*.– 2006.– Vol. 256, Issue 2.– P.185-194.
26. Branda S.S., Vic A. et al. Biofilms: the matrix revised. // *Trends Microbiol.*- 2005.- Vol. 13.- P. 21- 25.
27. Buc E. et al. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. // *PLoS ONE*.-2013.- Vol 8(2): e56964.
28. Buc E., Dubois D., Sauvanet P., Raisch J., Delmas J., Darfeuille-Michaud A., Pezet D., Bonnet R. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. // *PLoS ONE*.- 2013.- Vol. 8.- P. 2345-2356
29. Chiba T., Marusawa H., Ushijima T. Inflammation associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. // *Gastroenterology*.- 2012.- Vol. 143.- P. 550- 563;
30. Clemente J.C. et al. // *Cell*.- 2012.- Vol. 148.- P. 1258.
31. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. // *Appl Environ Microbiol.*- 2000.- Vol. 66(10).- P. 4555–8.
32. Cougnoux A., Dalmasso G., Martinez R., Buc E., Delmas J., Gibold L., Sauvanet P., Darcha C., Déchelotte P., Bonnet M., et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. // *Gut*.- 2014.- Vol. 63.- P. 1932–1942. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305257.
33. Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. // *Nature Reviews Microbiology*.– 2010.– Vol. 8.– P. 26-38.
34. Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I., Boury M., Oswald E., Nougayrede J.P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers

genomic instability in mammalian cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 2010.- Vol. 107.- P. 11537–11542.

35. Darfeuille-Michaud A. et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. // *Gastroenterology.*- 1998.- P. 1405- 1413.

36. Davies R.J., Miller R., Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. // *Nat. Rev. Cancer.*- 2005.- Vol. 5.- P. 199-209.

37. Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., DeStefano Shields C.E., Hechenbleikner E.M., Huso D.L., et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. // *Science.*- 2018.- Vol. 359.- P. 592- 597.

38. Dubois D, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. // *J Clin Microbiol.*- 2010.- Vol. 48(6).- P. 2122- 9.

39. Dubois D., Delmas J., Cady A., Robin F., Sivignon A., Oswald E., Bonnet R. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. // *J. Clin. Microbiol.*- 2010.-Vol. 48.- P. 2122- 2129.

40. Duncan A., Kapaniris O., Millard S. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology.*- 1993; 104(3): 802- 809.

41. Eaton K., Yang W. Reproducibility Project: Cancer Biology Registered report: Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. // *eLife.*- 2015; 4: e04186. DOI: 10.7554/eLife.04186

42. Eklof V., Lofgren-Burström A., Zingmark C., Edin S., Larsson P., Karling P., Alexeyev O., Rutegård J., Wikberg M.L., Palmqvist R. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. // *Int. J. Cancer.*- 2017. DOI: 10.1002/ijc.31011.

43. Elinav E. et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. // *Nat. Rev. Cancer.*- 2013.- P. 759–771.

44. Escobar-Paramo P. et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. // *Environ Microbiol.*- 2006.- Vol. 8(11).- P. 1975- 84.

45. Escobar-Paramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Rahimy M.C., Andremont A., Denamur E., Ruimy R. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. // *Appl Environ Microbiol.*- 2004.- Vol. 70.- P. 5698- 5700. DOI: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004.

46. Fairley T.L., Cardinez C.J., Martin J. et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998–2001. // *Cancer.*- 2006.- Vol. 107.- P. 1153-1161.

47. Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., Wang J., Darzi Y., Faust K., et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. // *Science.*- 2016 Apr 29.- Vol. 352 (6285).- P. 560- 564.

48. Fazeli M.S., Keramati M.R. Rectal cancer: a review. // *Med. J. Islam Repub. Iran.*- 2015.- Vol. 29.- P. 171.

49. Fischbach M.A., Lin H., Zhou L., Yu Y., Abergel R.J. et al. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 2006.- Vol. 103.- P. 16502- 16507.

50. Fitzstevens J.L., Smith K.C., Hagadorn J., Caimano M.J., Matson A.P., Brownell E.A. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. // *Nutr Clin Pract.*- 2016, Sep 27.

51. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. // *Nat. Rev. Microbiol.*- 2015.- Vol. 13.- P. 269- 284.

52. Friswell M.K., Alswied A., Roberts C.L., Song F., Flanagan P.K., Knight P., Codling C., Marchesi J.R., Winstanley C., et al. Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC*<sup>+</sup> *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. // *Gut.*- 2014.- Vol. 63.- P. 761- 770.

53. Grande M., Milito G., Attina G.M. et al. Evaluation of clinical, laboratory and morphologic prognostic factors in colon cancer. // *World J. Surg. Oncol.*- 2008.- Vol. 6.- P. 98.

54. Haq K., Mcelhaney J.E. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. // *Curr. Opin. Immunol.*- 2014.-Vol. 29.- P. 3 - 42.

55. Holmes B. Bacteria make major evolutionary shift in the lab. // *New Scientist.*- 2008.- P.1192-1205.

56. Homburg S., Oswald E., Hacker J., Dobrindt U. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. // *FEMS Microbiol Lett.*- 2007.- Vol. 275.- P. 255- 262.

57. Hooper L.V., Xu J., Falk P. G., et al. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 2011.- Vol. 96.- P. 9833- 9838.

58. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C., Harris K., Quince C., Jernberg C. et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. // *Gut.*- 2014 Apr.- Vol. 63 (4).- P. 559- 566.

59. Jemal A., Clegg L.X., Ward E. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. // *Cancer.*- 2004.- Vol. 101 (1).- P. 3- 27.

60. Jeter J.M., Kohlmann W., Gruber S.B. Genetics of colorectal cancer. // *Oncology.*- 2006.- Vol. 20 (3).- P. 269-276.

61. Johnson I.T., Lund E.K. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. // *Aliment. Pharmacol. Ther.*- 2007.- Vol. 26 (2).- P. 161-181.

62. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrede J.P., Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. // *J. Clin. Microbiol.*- 2008.- Vol. 46.- P. 3906- 3911.

63. Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Su L.K., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hedge P., McKechnie D. Identification

of FAP locus genes from chromosome 5q21. // *Science*.- 1991.- Vol. 253.- P. 661- 665.

64. Krieger J.N., Dobrindt U., Riley D.E., Oswald E. Acute Escherichia coli prostatitis in previously health young men: bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. // *Urology*.- 2011.- Vol. 77.- P. 1420–1425.

65. Krishnan S., Ramakrishna B.S., Binder H.J. Stimulation of sodium chloride absorption from secreting rat colon by short-chain fatty acids. // *Dig. Dis. Sci*.- 1999.- Vol. 44(9).- P. 1924- 1930.

66. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. // *Nature*.- 2012.- Vol. 489.- P. 220. DOI: 10.1038/nature11550.

67. Lucas C., Barnich N., Nguyen H.T. Microbiota. Inflammation and Colorectal Cancer. // *Int.J.Mol. Sci*.- 2017.- Vol. 18 DOI: 10.3390/ijms18061310.

68. Maloy K. J., Powrie F. //*Nature*.- 2011.- P. 298.

69. McCarthy A.J., Martin P., Cloup E., Stabler R.A., Oswald E., Taylor P.W. The Genotoxin Colibactin Is a Determinant of Virulence in Escherichia coli K1 Experimental Neonatal Systemic Infection. // *Infect. Immun*.- 2015.- Vol. 83.- P. 3704–3711.

70. Micenkova L., Benova A., Frankovicova L., Bosak J., Vrba M., Sevcikova A., Kmet'ova M., Smajs D. Human Escherichia coli isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. // *J. Med. Microbiol*.- 2017.- Vol. 307.- P. 182–189.

71. Morgan R.L., Baack B., Smith B.D., Yartel A., Pitasi M., Falck-Ytter Y. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. // *Ann Intern Med*.- 2013.- Vol.158.- P. 329- 337.

72. Nougayrede J.P., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Buchrieser C., Hacker J., Dobrindt U., Oswald E. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. // Science.-2006.- Vol. 313.- P. 848–851. DOI: 10.1126/science.1127059.

73. Nougayrede J.P., Taieb F., De Rycke J., Oswald E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. // Trends Microbiol.- 2005.- Vol. 13.- P. 103–110.

74. Nougayrede J.P. et al. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. // Science.- 2006.- Vol. 313(5788).- P. 848- 851.

75. Nowrouzian F.L., Oswald E. Escherichia coli strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. // Microb. Pathog.- 2012.- Vol. 53.- P.180- 182.

76. Nowrouzian F.L., Oswald E. 2012. Escherichia coli strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. // Microb Pathog.- 2012.- Vol. 53.- P. 180–182. DOI:10.1016/j.micpath.2012.05.011.

77. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. // Nature.- 2000.– Vol. 405.– P. 299-304.

78. Olier M., Marcq I., Salvador-Cartier C., Secher T., Dobrindt U., Boury M. et al. Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. // Gut Microbes.- 2012.- Vol. 3.- P. 501-509.

79. Payros D., Secher T., Boury M., Brehin C., Menard S., Salvador-Cartier C., Cuevas-Ramos G., Watrin C., Marcq I., Nougayrede J.-P., et al. Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring's intestinal homeostasis. // Gut Microbes.- 2014.-Vol. 5.- P. 313–325.

80. Poluektova E.A., Iyashenko O.S., Korolev A.V., Shifrin O.S., Ivashkin V.T. Mechanisms to ensure the interaction of bacterial cells with the host, and a violation of patients with inflammatory bowel disease patients. //

Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.- 2014.- Vol. 24(5).- P. 42- 53.

81. Pujo J., Martin P., Le Faouder P., Galano J.M., Guy A., Knauf C., Tabet J.C., Tronnet S., Barreau F., et al. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. // *Nat. Commun.*- 2017. Vol. 8.- P. 1314.

82. Putze J. et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. // *Infect Immun.*- 2009.- Vol. 77(11).- P. 4696- 703.

83. Putze J., Hennequin C., Nougayrede J.P., Zhang W., Homburg S., Karch H., Bringer M.A., Fayolle C., Carniel E., Rabsch W., et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. // *Infect. Immun.*- 2009.- Vol. 77.- P. 4696- 4703.

84. Raisch J, et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. // *World J Gastroenterol.*- 2014.- Vol. 20(21).- P. 6560- 72.

85. Ries L.A., Melbert D., Krapcho M. et al. SEER cancer statistics review, 1975–2005. // Bethesda.- 2008.

86. Santarelli R.L., Pierre F., Corpet D.E. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. // *Nutr. Cancer.*- 2008.- Vol. 60 (2).- P. 131- 144.

87. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. // *Gastroenterology.*- 2008.- Vol. 134.- P. 577- 594.

88. Shimpoh T., Hirata Y., Ihara S, Suzuki H., Kinoshita H. et al. Prevalence of pks- positive *Escherichia coli* in Japanese patients with or without colorectal cancer. // *Gut Pathog.*- 2017. DOI 10.1186/s13099-017-0185-x

89. Shimpoh T., Hirata Y., Ihara S., Suzuki N., Kinoshita H., Hayakawa Y., Ota Y., Narita A., Yoshida S., Yamada A., et al. Prevalence of pks-positive *Escherichia coli* in Japanese patients with or without colorectal cancer. // *Gut Pathog.*- 2017.- Vol. 9.- P. 35. DOI: 10.1186/s13099-017-0185-x.

90. Siegel R., Desantis C., Jemal A. Colorectal cancer statistics. // *A Cancer Journal for Clinicians*.- 2014.- Vol. 64 (2).- P. 104-117. DOI: 10.3322/caac.21220.

91. Sokurenko E.V., Hasty D.L., Dykhuizen D.E. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. // *Trends Microbiol.*- 1999.- Vol. 7.- P.191-195.

92. Sonnenburg J.L., Xu J., Leip D.D., et al. Glycan foraging in vivo by an intestine- adapted bacterial symbiont. // *Science*.- 2005.- Vol. 307.- P. 1955-1959.

93. Stinson L.F., Payne M.S., Keelan J.A. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. // *Crit Rev Microbiol.*- 2017 May.- Vol. 43 (3).- P. 52- 69.

94. Stock J. Gut microbota: an environmental risk factor for cardiovascular disease. // *Atherosclerosis*.- 2013.- Vol. 229 (2).- P. 440- 442.

95. Swidsinski A., Khilkin M., Kerjaschki D., Schreiber S., Ortner M., Weber J., Lochs H. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. // *Gastroenterology*.- 1998.- Vol. 115.- P. 281–286. DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70194-5.

96. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. // *Nat Rev Microbiol.*- 2010.- Vol. 8.- P. 207- 217. DOI: 10.1038/nrmicro2298.

97. Tiihonen K., Tynkkynen S., Ouwehand A., Ahlroos T., Rautonen N. The effect of ageing with and without non- steroidal anti- inflammatory drugs on gastrointestinal microbiology and immunology. // *Br. J. Nutr.*- 2008.- Vol. 100(1).- P. 130- 137.

98. Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., Dutilh B.E. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. // *Nat. Rev. Microbiol.*- 2012.- Vol. 10.- P. 575–582. DOI: 10.1038/nrmicro2819.

99. Tomkovich S., Yang Y., Winglee K., Gauthier J., Muhlbauer M., Sun X., Mohamadzadeh M., Liu X., Martin P., Wang G.P. et al. Locoregional

Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. // *Cancer Res.*- 2017.- Vol. 77.- P. 2620- 2632.

100. Vind I., Riis L., Jess T. et al. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: A Population-Based Study from the Danish Crohn colitis database. // *The American Journal of Gastroenterology.*- 2006.- Vol. 101, N 6.- P. 1274-1288.

101. Willett W.C. Diet and cancer: an evolving picture. // *JAMA.*- 2005.- Vol. 293 (2).- P. 233-234.

102. Yamauchi M., Morikawa T., Kuchiba A. et al. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. // *Gut.*- 2012.- Vol. 61 (6).- P. 847-854.

103. Zingmark C., Edin S., Larsson P., Karling P., Alexeyev O., Rutegard J., Wikberg M.L., Palmqvist R. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. // *Int. J. Cancer.*- 2017.

**ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ**

Зигангирова Нурия Нажибовна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ОСТРОВА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ (*pks*) *ESCHERICHIA COLI* NC101 В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА».

Представленная работа посвящена проблеме разработки новых подходов к пониманию и оценке роли вариантов *E. coli* NC 101, несущих гены острова *pks*, которые в настоящее время рассматривают в качестве одной из основных причин в этиологии воспалительных заболеваний кишечника и рака кишки.

За время обучения в БГМУ Зигангирова Н.Н. освоила учебную программу в полном объеме. Все годы училась только на «хорошо» и «отлично», совмещая учебу с научной работой в студенческом научном кружке.

В процессе выполнения ВКР Зигангирова Н.Н. овладела навыками работы с микроорганизмами. Освоила приемы их идентификации и исследования методом ПЦР. Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы, представлены в публикациях и в виде устных сообщений на конференциях, включая международные (БГМУ-2018 и др.).

В ходе выполнения ВКР Зигангирова Н.Н. продемонстрировала навыки самостоятельной работы и компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Зигангировой Н.Н. ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:  
д.м.н., профессор, зав.кафедрой  
фундаментальной и прикладной  
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России



А.Р.Мавзютов

### ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук Гималова Фуата Рамазановича. на выпускную квалификационную работу Зигангировой Нурии Нажибовны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ОСТРОВА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ (*pks*) *ESHERICHIA COLI* NC101 В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА».

Одним из наиболее привлекательных для изучения биологических объектов продолжает оставаться *Escherichia coli*. Научный интерес к ним резко возрос после того, как было показано, что некоторые варианты *E. coli* продуцируют вещества, способные негативно воздействовать на жизненный цикл клетки и её деление. Это позволило классифицировать их как цикломодулины или цитотоксины с генотоксическим эффектом. Впоследствии оказалось, что это связано с целым ферментным комплексом, детерминируемым мобильным генетическим кластером или «островом генотоксичности» (*pks*).

В этой связи поставленная автором задача по оценке частоты встречаемости генов «острова генотоксичности» (*pks*) среди клинических штаммов *E. coli*, выделенных, в том числе, и при опухолевой патологии кишечника представляет несомненный научный интерес.

В ходе проведения данного исследования автором были освоены все необходимые для решения этой задачи методы, включая ряд достаточно редких, ориентированных на исследования биоптатов.

Структурно в работе представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, собственные данные и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Зигангировой Нурии Нажибовны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ОСТРОВА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ (*pks*) *ESHERICHIA COLI* NC101 В БИОПТАТАХ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА», выполненная под руководством зав. кафедрой ФПМ, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершённой и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), а соискатель заслуживает оценки «отлично».

Доктор биологических наук,  
Ученый секретарь  
Института биохимии и генетики  
УФИЦ РАН



Фуат Рамазанович Гималов



Башкирский государственный  
медицинский университет

## СПРАВКА

### о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

**Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ**

Автор работы	<b>Зигангирова Нурия Нажибовна</b>
Факультет, кафедра, номер группы	<b>Б 401Б</b>
Тип работы	<b>Дипломная работа</b>
Название работы	<b>Молекулярно- генетическая детекция фрагментов ДНК острова генотоксичности (pks) Escherichia coli NC 101 в биоптатах при воспалительных заболеваниях кишечника.</b>
Название файла	<b>Молекулярно- генетическая детекция фрагментов ДНК острова генотоксичности (pks) Escherichia coli NC 101 в биоптатах при воспалительных заболеваниях</b>
Процент заимствования	<b>20,35%</b>
Процент цитирования	<b>8,27%</b>
Процент оригинальности	<b>71,38%</b>
Дата проверки	<b>13:10:18 22 июня 2018г.</b>
Модули поиска	<b>Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"</b>
Работу проверил	<b>Кобзева Наталья Рудольфовна</b> <small>ФИО проверяющего</small>
Дата подписи	<b>26.06.2018г.</b>

  
 Подпись проверяющего  
**ФГБОУ ВО БГМУ**  
**Минздрава России**  
**НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА**

Чтобы убедиться  
в подлинности справки,  
используйте QR-код, который  
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.