

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

Юмагужина Гульнара Камилевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ
ДНК ГЕНА КОЛИБАКТИНА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
профессор



А.Р. Мавзютов

Уфа – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.1 Современные представления о роли кишечной микрофлоры в развитии заболеваний
- 1.2 Нарушение микробиоты желудочно-кишечного тракта у больных
- 1.3 Общая характеристика *E. Coli*
- 1.4 Эпидемиология эшерихий
- 1.5 Болезнь Крона и адгезивно-инвазивные *E.coli*
- 1.6 Генотоксины *E.coli*
- 1.7 Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника
- 1.8 Лабораторные методы исследования

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- 2.1 Выделение препаратов ДНК из клинического материала
- 2.2. Выделение ДНК из биоптатов оптимизированным методом
- 2.3 Подбор и синтез специфических олигонуклеотидных праймеров
- 2.4 Проведение ПЦР - анализа препаратов ДНК *E.coli* на выявление гена колибактина
- 2.5 Электрофоретическое разделение ПЦР продуктов препаратов ДНК в агарозном геле

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

- 3.1 Подбор оптимальных праймеров для ПЦР-идентификации *E.coli* гена колибактина
- 3.2 Анализ обнаружения гена колибактина в *E.coli* исследуемом клиническом материале

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ПРИЛОЖЕНИЯ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колиборазующая единица

КР – коллатеральный рак

НЯК – неспецифический язвенный колит

ОКИ – острая кишечная инфекция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СРК - синдром раздраженного кишечника

УПМ – условно-патогенная микрофлора

CLB – colibactin

PKS–

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Во всем мире в практической гастроэнтерологии одной наиболее распространенной и острой проблемой являются воспалительные заболевания кишечника (ВЗК). К этой группе относятся болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), которые характеризуются хроническим воспалением, рецидивирующим в кишечнике у генетически предрасположенных лиц и подвергается воздействию определенных экологических факторов. В связи с отсутствием единой точки зрения на проблему ВЗК, в последние годы заметен рост количества больных не только с тяжелыми формами ВЗК (Дорофеев А.Э., 2010), доброкачественными опухолями, но и колоректальным раком (КРР) (Wong J.J., 2007).

Кишечная микрофлора человека состоит из 100 трлн микроорганизмов, относящихся к 36 000 видов. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта участвует в поддержании, как местного, так и системного гомеостаза хозяина-макроорганизма, но при нарушении жизнедеятельности кишечной флоры рост развития различных патологий к системе организма возрастает. Известно, что в 66-93% случаев ВЗК сопутствует дисбиоз кишечника [Халиф И.Л., 2004]. При этом влияние токсинов энтерогенных штаммов могут способствовать возрастанию синтеза провоспалительных цитокинов. Тем самым эти вещества оказывают влияние на межклеточное взаимодействие и внутриклеточную передачу, что провоцируют появление мутаций.

Одной из таких бактерий является *Escherichia coli*. Она синтезирует бактериальный токсин - колибактин, индуцирующий разрывы в ДНК, и приводящий к онкогенным мутациям (Nougayrede J.P., 2006). А также из семейства *Enterobacteriaceae* представителями носителя колибактина являются *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и *Citrobacter koseri* (Putze J., et al., 2009).

Функциональная связь между дисбалансом микроорганизмов, заселяющих кишечник, и канцерогенезом при хроническом воспалении предоставляет возможность улучшить понимание в молекулярных механизмах участия бактерий в онкогенезе. Возможно, бактерии являются объектом для скрининга предрасположенности и предотвращения рака человека (Arthur J.C. et al.,2012). Несмотря на то, что современная медицина имеет значительные достижения, этиология и патогенез ВЗК до конца не изучены. Представления о механизмах воспалительного процесса в кишечнике, а также защитных механизмах также плохо изучены. В связи с этим, проблема ВЗК становится все более актуальным и требует дальнейшего исследования.

Цель работы

Молекулярная - генетическая детекция и оценка частоты встречаемости фрагментов гена колибактина *Escherichia coli* при воспалительных заболеваниях кишечника.

Задачи исследования

1. Сбор клинического материала.
2. Выделение бактериальной ДНК из собранного клинического материала больных.
3. Подбор праймеров для выявления генетических детерминант ркs острова патогенности, содержащего гены *clb* (colibactin).
4. ПЦР - анализ образцов ДНК, выделенных из фекального материала больных среднетяжелыми формами острой кишечной инфекции и биоптатов.

Практическая значимость. Предложенный подход позволит разработать оптимальный метод и наборы реагентов для пробоподготовки и ПЦР обнаружения непосредственно в материале больных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Область применения результатов исследования.

Детекция генетических детерминант *rks* острова патогенности, содержащего гены *clb* (colibactin) бактерии *Escherichia coli* может стать основой при постановке диагноза и дальнейшего этиотропного лечения больных. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, лабораторной диагностике и при назначении лекарственных препаратов против них.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления о роли кишечной микрофлоры в развитии заболеваний

Кишечник – это один из самых больших и важных органов не только пищеварительной, но и иммунной системы человека. Считается, что четвертая часть его слизистой оболочки состоит из иммунологически активной ткани, в которой выделяют около 80% иммунокомпетентных клеток. (Александров В.А., 2006)

Микрофлора кишечника представляет собой согласованную группу микроорганизмов, находящиеся в симбиозе, которые поддерживают метаболическое, биохимическое и иммунное равновесие. Нормальная микрофлора человека это совокупность микробиоценозов, имеющие определенный состав и занимающие тот или иной биотоп в организме. У взрослого человека количество бактериальных клеток примерно в 10 раз превышает число его собственных, при этом большая их часть находится в ЖКТ, составляет 10^{10} – 10^{12} КОЭ/г фекалий. Во внутренней среде человека микроорганизмы находятся в сложных микробных группах, внутри которых возникают разнообразные формы их взаимоотношений. Кишечная микробиота формируется внутриутробно. Материнские иммунные клетки способны проникать через плаценту и определять формирование иммунного ответа у плода. Это, в свою очередь, активизирует процесс микробной колонизации. Затем на формирование кишечной микрофлоры и ее преобразование, оказывают влияние средовые факторы, среди которых является вскармливание. (Захарова И.Н.и др., 2009).

Микрофлора кишечника представлена облигатной и факультативной частью. Облигатная микрофлора представлена различными бактериями: бифидобактерии, лактобактерии, анаэробные пропионобактерии, кишечные палочки, бактериоиды, пептострептококки, энтерококки. Факультативная микрофлора представлена пептококками, стафилококками, стрептококки,

бациллы, дрожжи, фузобактерии, неферментирующие грамотрицательные палочки. Микрофлора, населяющая кишечник может находиться либо в свободном, либо в связанном состоянии, образуя биопленки. Биопленка представляет собой ассоциацию микроорганизмов, которая состоит из одного вида микроорганизмов, или нескольких, занимающих чувствительные рецепторы и колонизирующие на них. Биопленки препятствуют развитию патогенной микрофлоры, стимулируют воспроизводство нормофлоры и регулирует обменные процессы, тем самым обеспечивая нормальное функционирование кишечника. (Симонова Е.В. и др., 2008)

Важным и полезным эффектом кишечной микрофлоры, является защитная функция, осуществляющая в наибольшей степени путем колонизации проэпителиальной зоны, прямого воздействия на чужеродные микроорганизмы, проявление антиадгезивного эффекта, стимуляция иммунной системы. Значительную роль в системе противoinфекционной защиты играет приэпителиальный слизистый барьер, являющийся продуктом совместной симбиотической деятельности макроорганизма и его микрофлоры, состоящий из слоя слизи, молекул секреторного иммуноглобулина А, колоний симбионтной микрофлоры и ее метаболитов. Слизистый слой покрывает плотным слоем эпителиальные клетки, заполняя пространство между ворсинками, является наиболее мощным заслоном для условно- и безусловно-патогенной флоры. Он препятствует ее адгезии, колонизации эпителия и транслокации во внутреннюю среду организма. (Харченко Н.В. и др., 2003)

Основные функции нормальной микрофлоры кишечника:

1. Защитная функция. Формируется сопротивляемость колоний по отношению к патогенным бактериям, за счет формирования бактериостатических низкомолекулярных метаболитов (гистамин, глутамат, серотонин, короткоцепочные жирные кислоты и др.), уничтожение бактериальных токсинов, деконъюгация желчных кислот. *E.coli* продуцирует колицин, микроцин, которые обладают бактериостатическими свойствами, препятствующие развитию сальмонелл, шигелл, холерный вибрион. Одним

среди механизмов, регулирующий микробиоценоз, является блокада клеточных рецепторов. Низкомолекулярные метаболиты, предотвращают адгезию, предотвращают адгезию потенциально патогенных бактерий к эпителию;(Чаплин А.В. и др., 2017)

2. Детоксикационная. Детоксикационная функция заключается в поглощении различных токсинов микробиотой кишечника. Токсины поступают с пищей, которые образуются вследствие обработки различными гербицидами фруктов, овощей. Также в кишечнике происходят процессы брожения, гниения, при которых образуются бактериальные токсины. Слизистая оболочка кишечника препятствует всасыванию токсических продуктов в кровь. Токсические вещества образующиеся в кишечнике также связывает гликокаликс энтероцитов .В процессе детоксикации участвуют еще и ферменты кишечного сока.(Ребриков Д.В. и др., 2017)

3. Водно-солевой баланс. В организме человека образуется около 8 литров воды и электролитов. Вода всасывается в нижних отделах тонкого кишечника. Движение воды в кишечнике регулируется осмотическим давлением. Клетки всасывают воду и электролиты своей апикальной и базальной частью мембраны. Благодаря кишечным ворсинкам легко проникают всасываемые питательные вещества в жидкие среды организма. Глюкоза и белки всасываются в кровь частично и направляются к печени, где идет отложение углеводов. Глицерин, жирные кислоты под влиянием желчи всасываются в лимфу, далее попадают в кровеносную систему. (Чаплин А.В. и др., 2017)

4. Участие в метаболизме белков, углеводов, жиров, нуклеиновых кислот. Заключается в синтезе различных витаминов, аминокислот, гормонов, канцерогенных веществ. Микробиота кишечника участвует в синтезе микроэлементов. Кишечная палочка способна накапливать на своей поверхности ионы кальция, образуя кристаллы. (Чаплин А.В. и др., 2017)

5. Регуляция газового состава кишечника. Газовый состав кишечника зависит от жизнедеятельности бактерий в нем и локализацией в различных его сегментах. Наиболее активно эти процессы происходят в толстом кишечнике. В

газовый состав кишечника входят: азот, кислород, метан, водород, скатол, индол и др. Образование их происходит за счет бактериального метаболического процесса. А удаляются газы путем сорбации в крови и выдыхании через легкие, так же через отрыжку и др. Благодаря регуляции кишечником газового состава, в нем не происходят функциональные нарушения. (Чаплин А.В. и др., 2017)

6. Всасывание веществ. В кишечнике всасываются различные элементы: минеральные соли, вода, питательные вещества, продукты микробного гидролиза элементов пищи. Продукты всасывания, проникшие через стенки ворсинок, поступают в кровеносные и лимфатические сосуды. (Черешнев В. А и др., 2000)

7. Иммунная защита. Благодаря микробиоте кишечника происходит запуск и активация синтеза неспецифических факторов защиты, такие как гуморальные (лизоцим, пропердин, система компонента комплемента) и клеточные (фагоцитоз). Так же иммунная защита включает в себя стимулирование созревания лимфоидного аппарата кишечника и стимуляцию продукции интерферона и цитокинов. (Е.М. Булатова и др., 2009)

Микрофлора человека является генетической детерминированной системой. Микробиоценоз человека есть составляющая генома человека. Нормальная микрофлора представляет большое видовое разнообразие и препятствует развитию изменений в условиях физиологического стресса. Кишечная микробиота играет важную роль в регуляции энергетического гомеостаза. Под воздействием различных факторов, оказывающее отрицательное воздействие на микробиом человека, происходит дисбаланс между нормальной микрофлорой и патогенной, приводящий к различным воспалительным заболеваниям, а так же к иммуноопосредованным, аллергическим состояниям. Дисбиозы могут возникать в любом биотопе организма, но наиболее стойкие возникают в кишечной микробиоте. Дисбиоз кишечника – клинический комплекс нарушений, вызванный нарушением

количественного состава и свойств кишечной микрофлоры. (Чеснокова М.Г. 2003)

Причинами дисбиозов могут быть различные заболевания системы органов пищеварительного тракта. Но наиболее опасные формируются у новорожденных, при первичных нарушениях нормобиоценозов. При формировании первичной биопленки, образовавшиеся дефекты в ней и отсутствия адекватного лечения, приводит к присутствию постоянного эндогенного источника условно-патогенной флоры с повышенной резистентностью к медикаментозной терапии. Эти первичные патологические биоценозы, содержащие агрессивный потенциал и измененные биологические свойства провоцируют в организме аллергические реакции, иммунодефицитные состояния и инфекционные вспышки патологий. (Чеснокова М.Г. 2003)

Функции нормофлоры нарушаются, и становится очевидной этиопатогенетическая роль патологически измененных биоценозов в нарушениях морфо-функционального статуса организма-хозяина. Прежде всего расстраиваются функции кишечника, где нарушается всасывание питательных веществ, минеральных компонентов, особенно железа и кальция, ухудшается снабжение организма биологически активными микробными метаболитами, что влечет за собой развитие метаболитных расстройств. Токсичные продукты метаболизма излишне размножившейся условно-патогенной флоры усиливают симптомы интоксикации, снижают детоксикационную функцию печени, угнетают регенерационные процессы в слизистой оболочке, а дефицит облигатных сахаролитических анаэробов ухудшает энергообеспечение клеток эпителиальной ткани, вызывая ее дистрофические изменения. (Белоусова Е. А. 2010)

Избыточное микробное заселение тонкой кишки приводит к нарушения всасывание белков, жиров и углеводов. Вследствие изменения кислотности кишечного химуса снижается активность пищеварительных ферментов. Разрушение желчных кислот приводит к потере их с калом, усилению моторики толстой кишки, нарушению всасывания жирорастворимых витаминов.

Увеличение количества условно-патогенных бактерий ведет к усилению ее агрессивных свойств. Последствием этих изменения является воспаление слизистой оболочки кишечника, развитие деструктивных и некротических процессов в стенках. Так же при большом увеличении в кишечном биотопе концентрации условно-патогенных аэробов (эшерихий и других энтеробактерий, энтерококков, стафилококков и др.) возможен обмен данных микроорганизмов по портальной венозной системе. При этом в первую очередь поражается печень и желчные ходы с большой вероятностью развития холангита или холецистита. Далее эти желчerezистентные клоны патогенов с током желчи обсеменяют 12-перстную кишку и реколонизируют кишечник, углубляя кишечные расстройства за счет непрерывной циркуляции клеток агрессивной флоры по замкнутому патогенетическому кругу: кишечник – портальная венозная система – печень – желчь – кишечник. В такой ситуации создается опасность поражения других органов (почек, мочевыводящей системы, легких, головного мозга, селезенки, сердца, костей и др.). (Харченко Н.В. и др., 2003)

1.2 Нарушение микробиоты желудочно-кишечного тракта у больных

Микрофлора кишечника выполняет много важных функций, как на местном, так и на системном уровне и участвует в развитии и поддержание заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Дисбаланс микробиоты происходит по различным причинам, но основной является изменение условий обитаний в биотопе, по этой причине популяция одного или нескольких видов, получают преимущества для активного размножения и роста, приняв доминирующее положение. Изменения количественного и качественного состава кишечной микрофлоры могут благоприятствовать возникновению различных расстройств, сопутствующие определенными клиническими проявлениями. Поддержания нормального функционирования тонкого кишечника создается низкой рН, эффективным пищеварением и всасыванием,

активной перистальтикой кишечника, нормальной работой клапана, который препятствует обратного поступления бактерий. При нарушении бактериального состава, баланс сдвигается в сторону положительных и анаэробных штаммов, снижается концентрация конъюгированных желчных кислот, нарушается всасывание жиров и жирорастворимых витаминов. Вследствие этого желчные кислоты разрушают эпителий слизистой кишечника, что приводит к нарушению всасывания аминокислот, углеводов и витаминов. Также накапливаются бактериальные токсины, протеазы, свободные желчные кислоты, гидроксиды жирных кислот, фенолы, биогенные амины. Избыточное обсеменение может привести к повреждению слизистой, деструкции микроворсинок, углубление крипт. Несомненно изменение микробиоты является очень важным механизмом определенной патологии кишечника. К нарушениям микробиоты кишечного тракта могут привести различные причины:

-Антибактериальная терапия, гормонотерапия, применение цитостатиков. Антибиотики подавляют рост патогенной флоры, но так же затрагивают и симбиотическую флору, нарушая гомеостаз организма. Продолжительное применение антибиотиков создают отличную среду для развития резистентных к антибиотикам микроорганизмов. Самый частый побочный эффект антибиотикотерапии является антибиотик-ассоциированная диарея (ААД). Антибиотики в большом количестве поражают лакто- и бифидобактерии. Вместо них начинают размножаться патогенные бактерии, отравляя организм продуктами жизнедеятельности, вызывая первые клинические симптомы в виде колик в животе. Нарушается метаболическая функция кишечника, затрудняется расщепление клетчатки, вследствие нарушается перистальтика кишечника, всасывание воды и синтез желчных кислот. (Лазарева Т.С. и др., 2009)

-Нарушение в питании (режим, рацион). В рационе человека должны присутствовать различные витамины, вещества, помогающие перевариванию пищи в кишечнике. Обязательно присутствие клетчатки. Клетчатка, имеет

грубую структуру, ускоряя процесс переваривания. Она служит , источником энергии , снижает холестерин. Набухая, клетчатка очищает и выводит все шлаки из за организма. (Лазарева Т.С. и др., 2009)

-Стрессы. Стресс негативно сказывается на организме в целом. Снижается количество полезных бактерий (лактобактерии, бифидобактерии). По многочисленным исследованиям ученые выяснили, что прием пробиотиков снижает уровень кортизола. (Александров В.А и др., 2006)

-Снижение иммунного статуса. Кишечный иммунитет обеспечивает защиту организма от внедрения и токсического воздействия чужеродных антигенов, стимулирует иммунный ответ, повышает фагоцитарную активность, стимулирует образование В-лимфоцитов и плазматических клеток. При снижении иммунологической реактивности организма, уменьшается выработка иммуноглобулинов(Ig А), В-лимфоцитов и плазматических клеток. Иммуноглобулины Ig А связывают антигены вирусов и бактерий, блокируют прикрепление вирусов и бактерий к слизистой кишечника. Вследствие этого возникает возрастание условно-патогенных бактерий, развивается дисбактериоз и кишечника воспалительные заболевания кишечника, ухудшается перистальтика. (Лазарева Т.С. и др., 2009)

-Функциональные нарушения моторики. Микрофлора кишечника вырабатывает коротко-цепочечные жирные кислоты, которые обеспечивают нормальную моторику ЖКТ. Так же бактерии вырабатывают гистамин, серотонин, ГАМК. При нарушении количественного и качественного состава бактерий кишечника, ухудшается моторика кишечника. (Лазарева Т.С. и др., 2009)

Литературные данные об участии микробов в развитии ВЗК за последнее время увеличиваются с каждым годом. Микробный дисбаланс или «дисбактериоз» является одним из ключевых игроков в затяжном течении воспалительного процесса в ВЗК. Дисбактериоз возникает по разным причинам, они бывают как экзогенными, так и эндогенными. В начале происходит нарушение гомеостаза и иммунных защитных механизмов, в последствии развития воспалительных заболеваний. Изменяется

качество и количество аутофлоры.. Ключевым звеном в развитии дисбактериоза является изменения количества анаэробов, а так же бифидобактерий, лактобактерий и эубактерий, обладающих высокой антагонистической активностью. Все это приводит к благоприятному развитию условно-патогенных энтеробактерий. При дисбактериозе происходит увеличения количество условно-патогенных бактерий, которые обладают сложными плазмидами резистентности, включающие в себя гены, вырабатывающие различные токсины. (например генотоксин колибактин, который продуцирует *E.coli*). *E.coli* обладает гемолитической активностью и у онкологических больных при дисбиозе выделяют около 90% кишечных палочек с таким свойством. (Хавкин А.И. ,2003)

Усиленное возрастание количество патогенных бактерий приводит к увеличению продуктов распада (индол, скатол, водород) и попадании через кровь в печень ведет к ее интоксикации. Так же дисбиоз приводит к иммунодефициту, аллергическим реакциям, опухолевые процессы. При образовании кишечной палочки с изменёнными свойствами, лактозонегативных энтеробактерий и их гемолитических форм наблюдается неустойчивый стул, поносы, патологические примеси.. Микрофлора толстой кишки претерпевает глубокую перестройку, причём слизистая толстой кишки нередко колонизируется условно-патогенными бактериями. Дисбиотические изменения в микробиоте кишечника насчитывают еще до каких-либо клинических проявления и являются предвестником серьезных патологических отклонений. Далее появляются местные симптомы, в связи с нарушением баланса, затем и общие ,ухудшающие течение различных заболеваний. К клиническим состояниям и синдромам,патогенез которых связан с нарушением микробиоты, относят СРК, диарею, запоры, гастриты, язвенная болезнь желудка, злокачественные новообразование желудка и кишки. У большинства больных с СРК в 68% случаях выявлялась избыточная обсемененность бактериями в тонкой кишке и в 98% в толстой кишке. Микрофлора представлена различными бактериями при этом присутствовала гемолизирующая флора, кишечная палочка с измененными ферментативными свойствами, энтеропатогенные кишечные палочки , а так же преобладание условно-патогенной микрофлоры : стафилококки, протеи, дрожжеподобные бактерии,

лактозонегативные кишечные палочки, синегнойная палочка, клибсиелла. При дисбиозе так же изменяются свойства, появляются штаммы, обладающие инвазивностью и агрессивной по отношению к слизистой оболочке. (Лыкова Е.А. и др., 2005)

1.3 Общая характеристика *E.Coli*

Escherichia coli является грамотрицательной, необязательной анаэробной, стержнеобразной бактерией кишечной палочки рода *Escherichia*, которая обычно встречается в нижнем отделе теплокровных организмов. Большинство штаммов кишечной палочки безвредны, но некоторые серотипы могут вызвать серьезное пищевое отравление у людей. Безвредные штаммы являются частью нормальной микробиоты кишечника и могут приносить пользу их хозяевам, производя витамин К₂ и предотвращая колонизацию кишечника патогенными бактериями, имеющими симбиотические отношения. *E. coli* высвобождается в окружающую среду с фекалиями. (Воробьев А.В. , 2003)

E. coli и другие факультативные анаэробы составляют около 0,9% микробиоты кишечника, а фекально-оральная передача является основным путем, по которому патогенные штаммы бактерий вызывают заболевание. Клетки способны выжить вне организма в течение ограниченного промежутка времени, что делает их потенциальными индикаторными показателями для проверки образцов окружающей среды для фекального загрязнения. Тем не менее, все больший объем исследований изучил экологически устойчивую *E.coli*, которая может выживать в течение длительного периода времени за пределами организма. (Воробьев А.В. , 2003)

Бактерию можно выращивать и культивировать легко и недорого в лабораторных условиях, и ее интенсивно исследовали более 60 лет. *E. coli* представляет собой хемогетеротроф, химически определенная среда должна включать источник углерода и энергию. *E. coli* является наиболее широко изученным организмом прокариотической модели и важным видом в области биотехнологии и микробиологии, где он служил объектом для большинства работ с рекомбинантной ДНК. (Воробьев А.В. , 2003)

Морфология и тинкториальные свойства. *E. coli*–грамотрицательные бактерии, длиной 2-3мкм с закругленными концами, в мазках располагаются беспорядочно; не образуют спор, некоторые штаммы имеют микрокапсулу;

перитрихи; кроме жгутиков, иногда обнаруживаются пили (Воробьев А.В. , 2003).

Культивирование. Кишечная палочка – факультативный анаэроб; не требовательна к питательным средам, хорошо растет на простых питательных средах при температуре 37°C и рН среды 7,2-7,4, вызывая диффузное помутнение жидкой среды и образуя обычные колонии на плотных средах. Используют дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина . В анаэробных условиях *E. coli* образует в качестве продукта жизнедеятельности лактат, сукцинат, этанол, ацетат и углекислый газ. При этом образуется молекулярный водород, который мешает образованию указанных выше метаболитов, поэтому *E. coli* часто сосуществует с микроорганизмами, потребляющими водород - например, с метаногенами или бактериями, восстанавливающими сульфат. (Воробьев А.В. , 2003)

Резистентность. Среди других энтеробактерий *E. coli* отличается более высокой резистентностью к действию различных факторов окружающей среды.

Источником энтеральных эшерихиозов являются больные люди и животные. Механизм передачи инфекции фекально-оральный, основные пути передачи – пищевой, контактно-бытовой. Заболевание чаще носит характер вспышек.

Патогенез. Входные ворота инфекции – полость рта. *E. coli*, попадая в тонкую кишку и обладая тропизмом к клеткам ее эпителия, адсорбируется на них с помощью пилей и белков наружной мембраны. Бактерии размножаются, погибают, освобождая эндотоксин, который усиливает перистальтику кишечника, вызывает диарею, повышение температуры, признаки общей интоксикации. Кроме того, кишечная палочка выделяет экзотоксин, обуславливающий более тяжелую диарею, рвоту и значительное нарушение водно-солевого обмена. (Воробьев А.В. и др. , 2003)

Клиническая картина. Инкубационный период продолжается от 2 до 6 дней. Заболевание начинается остро с повышения температуры тела, поноса, рвоты. Развивается обезвоживание, могут появиться кровь в испражнениях,

признаки поражения почек. Формы энтеральных эшерихиозов могут быть различные – от бессимптомной до токсикосептической. Иммуитет после перенесенного заболевания непрочный и непродолжительный. Микробиологическая диагностика. Основной материал для исследования – испражнения. (Воробьев А.В. и др. , 2003)

Кишечная палочка – типичный представитель микрофлоры толстой кишки. Осуществляет ряд полезных функций, в том числе антагониста патогенных кишечных бактерий, гнилостных бактерий, грибов рода *Candida*, принимает участие в синтезе витаминов группы В, Е, К2. В толстом кишечнике обитают *E. coli*, относящиеся к серогруппам О2, О7, О9 и др. *E. coli* широко используется в научных и практических целях, являясь универсальной генетической моделью, объектом, широко применяемым в генетической инженерии и биотехнологии. Ее также используют как санитарно-показательный микроорганизм для выявления фекального загрязнения объектов окружающей среды. Однако *E. coli* может причинить вред и ухудшить состояние человека. Условно-патогенные штаммы, обитающие в толстой кишке, при ослаблении иммунной системы организма могут вызвать различные гнойно-воспалительные заболевания за пределами пищеварительного тракта. Существуют также и безусловно патогенные штаммы *E. coli*-диареогенные или энтеропатогенные, кишечные палочки (ЭПКП), которые, попадая в организм извне, вызывают вспышки заболеваний, именуемых энтеральными (кишечными, эпидемическими) эшерихиозами. (Корнейчук Е.П. и др., 2015)

Есть более 700 серотипов кишечной палочки. Их свойства основаны на трех различных антигенах: антиген О (соматический), антиген Н (жгутиковый), антиген К (поверхностный).

Патогенные *E. coli* подразделяют на 4 группы: энтеропатогенные (ЕРЕС), энтеротоксигенные (ЕТЕС), энтероинвазивные (ЕИЕС) и энтерогеморрагические (ЕНЕС).

Энтеротоксигенные эшерихии колонизируют тонкий кишечник и вызывают холероподобные заболевания. Носительство после выздоровления не

формируется. Чаще всего встречаются в Индии. У нас - в южных регионах. Источники заражения - пища и вода. Пик заболеваемости приходится на детей от года до трех лет. Заражающая доза - 10⁸ - 10⁹ бактерий, или иначе - колониеобразующих единиц (КОЕ), в 1г кала. (Корнейчук Е.П. и др., 2015)

Энтероинвазивные *E.coli*, такие как O136, O159, O167, O28, O29, O112, O124: H30, O124: H32, имеют такой же фактор патогенности как у шигелл - бактерий, вызывающих дизентерию. Поэтому симптоматика заболевания напоминает дизентерию. У больного наблюдается непродолжительная водянистая диарея, которая к концу первых суток заканчивается "дизентерийным плевком" - комком слизи. В отличие от предыдущей группы, заболевание, вызванное энтероинвазивными *E. coli* характеризуется очень высокой температурой и продолжительностью (острый период - до двух недель). Встречаются ЕИЕС повсеместно, заражение происходит также в основном через пищу и воду. Колонизируют толстый кишечник. Чаще всего болеют дети до 2-ух лет. Заражающая доза - 10⁵ КОЕ в 1г кала. (Корнейчук Е.П. и др., 2015)

Энтеропатогенные эшерихии вызывают инфекции, по симптоматике заболевания сходные с сальмонеллезом. Заражающая концентрация - от 10⁵ до 10¹⁰ КОЕ/г. Дети чаще всего получают внутрибольничные штаммы ЕРЕС, либо заражаются контактно-бытовым путем (полотенца, постельное белье). Взрослые приобретают энтеропатогенных эшерихий через продукты. В Соединенных Штатах Америки энтеропатогенные *E. Coli* стоят на первом месте среди кишечных заболеваний детей. Симптомы: водянистая диарея, тошнота, рвота. Заболевание длительное - до 15 дней. Может формироваться носительство после выздоровления. (Корнейчук Е.П. и др., 2015)

Самая опасная, но наиболее редкая группа - энтерогеморрагические или веротоксические эшерихии. К ним относится пока одна серогруппа - O157: H7. Открыты они были впервые в 80-ых годах и первая вспышка произошла в США (в доме престарелых, через плохо прожаренные гамбургеры). Потом - в Японии. Причем в одном офисном здании заболели практически 1000 человек

(ели каракатиц, которые были выловлены в прибрежной зоне). На 30 лет человечество забыло об этом кошмаре, но в 2011 году Европу всколыхнула весть об эпидемии энтерогеморрагической *E.coli*. Фактор патогенности - шигеллоподобный токсин, который превосходит по токсичности шигеллезный в сотни раз. Обитает в толстом кишечнике. Клиническая картина при заболевании следующая: боли в животе, холероподобная диарея, которая в течение нескольких часов переходит в кровавый понос. Если нет острой почечной недостаточности, в комплексе с низким содержанием тромбоцитов и анемией (все это называется гемолитико-уремическим синдромом, или ГУС). (Корнейчук Е.П. и др., 2015)

1.4 Эпидемиологии эшерихий

Кишечные заболевания - группа заболеваний, вызванные бактериями, вирусами, простейшими и объединенные общим механизмом передачи, локализацией в организме. У всех кишечных заболеваний фекально-оральный механизм передачи, и поражают различные отделы кишечника. (Калина Г.П.,1982)

Пути заражения - водный и пищевой. В некоторых случаях возможен и контактный путь заражения. Клиническим проявлением этих болезней является диарея. Источником заболевания - является больной человек или бактерионоситель.(Халявина А.П. и др., 2009)

Наиболее эпидемиологически значимые эшерихиозы и опасные для человека являются эшерихиозы, вызванные ЭПКП и ЭИКП, менее - болезненные эшерихиозами, обусловленными ЭТКП, ЭГКП и ЭАКП. Период передачи инфекции зависит от свойств возбудителя. При эшерихиозах, вызванных ЭТКП и ЭГКП, больной заразен только в первые дни болезни, при заболеваниях, обусловленных ЭИКП и ЭПТК, - 1-2 нед (иногда до 3 нед). Носители выделяют возбудитель непродолжительное время, причём дети - более длительно. (Халявина А.П. и др., 2009)

Механизм передачи - фекально-оральный, пути передачи - пищевой, водный и бытовой. Инфицирование ЭТКП и ЭИКП чаще происходит пищевым путём, а ЭПКП - бытовым. В числе пищевых продуктов преобладают молочные изделия, готовые мясные блюда, напитки (компот, квас и др.), салаты из варёных овощей. Возбудитель в условиях больницы и детских садов может распространяться через игрушки, руки матерей. При энтерогеморрагических эшерихиозах заражение людей идет при употреблении в пищу плохо обработанного термически мяса, а также сырого молока. Передача водным путем происходит реже; наибольшую опасность несет интенсивное загрязнение открытых водоемов, при сбросе необезвреженных бытовых и сточных вод, особенно из инфекционных больниц. (Сергевнин В.И. , 2008)

Естественная восприимчивость к эшерихиозам довольно высока, однако она разная в различных возрастных группах населения. Вызывает нестойкий группоспецифический иммунитет, после перенесенного заболевания.

Основные эпидемиологические признаки. Распространено заболевание повсеместно. Эпидемиологические признаки различных эшерихиозов, отличаются в зависимости от серовара. ЭПКП - возбудители энтероколитов у детей первого года жизни. Вспышки заболеваемости регистрируют в детских учреждениях и больницах. Возбудители передаются контактно-бытовым путём - через руки взрослых и различные предметы. Бывают и пищевые вспышки инфекции, при искусственном вскармливании грудных детей.

ЭИКП - возбудители дизентериеподобных заболеваний у детей старше 1 года и взрослых. Выделение бактерий длится в течении одной недели. Возбудитель передаётся через воду и пищу. Эпидемический процесс дизентериеподобных эшерихиозов протекает, как правило, в виде групповых заболеваний и вспышек при употреблении заражённой воды и пищи. Заболевания отличает летне-осенняя сезонность. (Халявина А.П. и др., 2009)

ЭТКП - возбудители холероподобных заболеваний у детей в возрасте до 2 лет и взрослых. Эти возбудители широко распространены в странах с жарким климатом и плохими санитарно-гигиеническими условиями. Чаще регистрируют спорадические, реже групповые заболевания. В Российской Федерации ЭТКП выделяют редко, чаще при расшифровке «завозных» случаев заболеваний, составляющих основную группу так называемой «диареи путешественников». От больных бактерии выделяют 7-10 дней. Заражение происходит через воду и пищу. Контактно-бытовая передача маловероятна, так как для заражения имеет значение доза возбудителя.

Эпидемиология эшерихиозов, вызываемых ЭГКП, изучена недостаточно. Известно, что заболевания преобладают среди детей старше года и взрослых, также зарегистрированы вспышки в домах престарелых. Установлено, что природный биотоп ЭГКП 0157:H7 - кишечник крупного рогатого скота.

Важное влияние на заболеваемость эшерихиозами оказывают санитарно-гигиенические условия жизни людей (благоустройство жилья, обеспеченность доброкачественной питьевой водой и пищевыми продуктами и др.). Общий признак всех форм эшерихиозов - отсутствие взаимосвязи между заболеваемостью и группами населения по профессии или роду занятий. (Халявина А.П. и др., 2009)

Кишечные инфекции встречаются во всех возрастных группах, но чаще всего болеют дети грудного и раннего возраста, для которых характерна неустойчивость процессов пищеварения и метаболизма, незрелость ферментных систем и регуляторных механизмов, недоразвитость лимфоидного аппарата кишечника. Нормальная работа кишечника происходит благодаря нормальной работе защитных барьеров желудочно-кишечного тракта. Важным звеном защитного барьера является *иммунная система*. Кишечник представляет собой самую мощную защиту иммунитета. (Каврук Л.С. , 1995)

Порядка половины всех лимфоцитов, в особенности Т-лимфоциты, располагаются в кишечнике:

- 1) в собственной пластинке слизистой оболочки (В-лимфоциты, содержащие IgA);
- 2) межэпителиальные лимфоциты (популяция Т-лимфоцитов);
- 3) лимфоидные фолликулы (до 40 % Т-лимфоцитов и антигены активированных В-лимфоцитов, секретирующих IgA).

Секреторная система защиты представлена, прежде всего, иммуноглобулинами А, продуцируемые бокаловидными клетками, которые препятствуют прилипанию и колонизации бактерий на слизистой оболочке, блокируя антигенные компоненты на поверхности бактерий, а также иммуноглобулином Е, продуцируемый тучными клетками.

По этиологии, кишечные инфекции бывают:

- 1) вирусные;
- 2) бактериальные;
- 3) грибковые;
- 4) протозойные.

По патогенезу и клинико-морфологическим проявлениям разделяют на 2 группы:

- 1) болезни, имеющие циклическое течение, обусловленное генерализацией микроорганизма (бактериемией).
- 2) болезни, не имеющие циклического течения, носящие преимущественно местный характер. (Чумаченко Г.В. , 2016)

1.5 Болезнь Крона и адгезивно-инвазивные *Escherichia coli*

Болезнь Крона (БК) – многосистемное заболевание, характеризующееся гранулематозным, трансмуральным поражением и воспалением отделов ЖКТ. В основном локализацией патологического процесса при болезни Крона является дистальный отдел тонкой кишки и проксимальный отдел толстой кишки. Этиология заболевания носит комплексный характер, в основе которой лежит агрессивный иммунный ответ на компоненты кишечной микробиоты у генетически предрасположенных лиц. (И.В. Маев и др., 2015)

Причиной воспаления при БК может быть отсутствие толерантности к антигенам, присутствующим в нормальной микробиоте. Пациенты с БК имеют серьезные отклонения микробиома кишечника, проявляющиеся дисбиозом. Эти изменения характеризуются снижением количества большинства условно положительных видов бактерий (*Firmicutes* и *Bacteroidetes*) и повышением микроорганизмов, обладающих патогенными свойствами (*Enterobacteriaceae*). При этом общий состав микрофлоры у пациентов с БК характеризуется снижением разнообразия. (И.В. Маев и др., 2015)

У некоторых пациентов с БК имеются нарушения компонентов врожденного иммунитета. Так, в полногеномных исследованиях были выявлены мутации генов, регулирующих процессы врожденного иммунитета, включая рекогницию бактериальной формы и аутофагию (NOD2/CARD15, ATG16L1 и IRGM). (И.В. Маев и др., 2015)

Ген NOD2/CARD15 кодирует цитозольный белок NOD2, который является внутриклеточным форма-распознающим рецептором, связывающим мурамил-дипептид (МДП) – компонент бактериального пептидогликана стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий. Мутации гена NOD2/CARD15 затрагивают регион рекогниции МДП, нарушая привязку МДП к белку NOD2. Помимо этого, с риском развития БК ассоциированы мутации генов ATG16L1 и IRGM, регулирующих процесс аутофагии – селективной утилизации микроорганизмов в лизосомах клетки. Несостоятельность процесса аутофагии может снижать клиренс ряда бактерий, обладающих патогенными

свойствами. Ввиду этого в настоящий момент активно исследуется взаимосвязь БК с возможными каузативными инфекционными агентами, в частности адгезивно-инвазивными *Escherichia coli* (АИЕС) .(И.В. Маев и др., 2015)

Большинство *E.coli* обладают способностями к адгезии к эпителиоцитам слизистой оболочки, проникновению в них, а также к активной репликации внутри макрофагов. Данный фенотип *E. coli* получил название АИЕС. К настоящему времени было показано, что штаммы АИЕС, изолированные от больных БК, обладают определенной гетерогенностью.

Проведенные к настоящему времени экспериментальные исследования показали роль АИЕС в индукции патологического процесса, сходного с БК. АИЕС (штамм LF82) способны индуцировать тяжелый колит, ассоциированный с низкой выживаемостью, потерей массы тела, ректальными кровотечениями на фоне эрозивного повреждения слизистой кишечника. (И.В. Маев и др., 2015)

АИЕС обладают целым рядом вирулентных свойств. Микроорганизмы экспрессируют фимбрии 1-го типа (FimH), обеспечивающие адгезию к эпителиоцитам слизистой оболочки кишечника. Помимо этого, фимбрии 1-го типа обладают способностью к связи с белком GP2 на апикальной поверхности М-клеток, покрывающих пейеровы бляшки. Инвазия в эпителиальные клетки осуществляется посредством взаимодействия OmpC АИЕС и поверхностного гликопротеина GP96 энтероцитов. Важной особенностью АИЕС является их способность к выживанию и активной репликации внутри макрофагов. При этом в макрофагах не активируется процесс клеточной гибели, в том числе и апоптоз .(И.В. Маев и др., 2015)

1.6 Генотоксины *E.coli*

Некоторые бактерии способны повреждать ДНК, посредством продукции генотоксинов - токсических активных форм кислорода и реактивного азота. Такими примерами генотоксинов является колибактин, который продуцируют некоторые штаммы сапрофитной кишечной палочки (*E.coli*), и цитотоксический некротический фактор (CDT). Колибактин работает во время G2/M клеточного цикла. Они образуют ковалентные связи между ароматическими аминами, вызывая мутации, и препятствуют точной репликации ДНК. Этот механизм положен в основу развития рака кишечника. (Кутихин А.Г и др.,2012.)

Колибактин является вторым бактериальным генотоксином, идентифицированным в 2006 году. Анализ генов, присутствующих в геноме, выявил пять основных филогенетических групп, классифицированных как А, В1, В2, D и E. В то время как группа А включает в основном непатогенные штаммы, группа В2 включает как условно-патогенные, так и патогенные штаммы, такие как EхPEC, а также недавно описанный патовирус адгезивных инвазивных штаммов *E. coli* (AIEC), которые выделены из биопсии подвздошной кишки пациентов с болезнью Крона.(статья колибактин №3) Группа В2 рано появилась в филогенетическом дереве *E. coli* и проявляет наивысшее разнообразие генов (рис.1). До 30% штаммов *E. coli* группы В2 переносят в своем геноме кластер *rks*-гена, ответственный за синтез нерибосомального пептид-поликетидного гибрида, названного колибактином (рис.1). Показано, что штаммы *E.coli* филогенетической группы В2 способствуют остановке клеточного цикла и прогрессивному увеличению тела клетки и ядра. Активность была связана с наличием геномного острова, расположенного в локусе *asnW* тРНК(рис.2). Островки прилежат к генам тРНК, а также включают в себя другие гены интеграз.

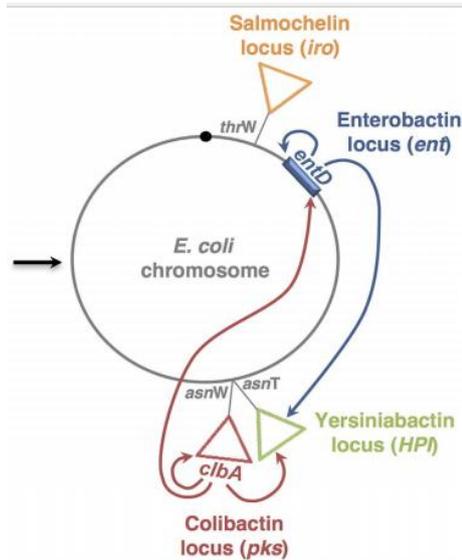


Рис.1 Хромосома штаммов филогенетической группы B2 *E. coli*. Представлены локусы, кодирующие энтеробактин (*ent*), иерсинибабактин (HP), салмофелин (*iro*) и колибактин (*pks*). Стрелки, происходящие из EntD и ClbA и указывающие на другие локусы, иллюстрируют способность PPTase (фосфопантетинилтрансфераза) вносить вклад в синтез метаболитов из других локусов. DOI: 10.1371 / journal.ppat.1003437.g008

Этот остров называют *pks* и содержит 23 предполагаемые открытые рамки считывания (ORF), в том числе три нерибосомальных пептидных мегасинтетаз (NRPS), три поликетидных мегасинтетаз (PKS), две гибридные NRPS / PKS мегасинтетазы и десять дополнительных (рис.3). Анализ мутаций показал, что все PKS и NRPS и восемь дополнительных генов необходимы для воспроизводства активного генотоксина, что указывает на то, что токсичность обусловлена гибридным цитотоксином, состоящего из поликетид-пептида, который был назван колибактином. (Francesca Grasso and Teresa Frisan, 2015)

Колибактин - сидерофор поликетидной природы, способный проникать в ядро клетки хозяина и связываться там с ДНК, нарушая нормальный процесс репликации, становясь фактором риска развития злокачественных опухолей. Синтез этого пептид-поликетид обеспечивается кластером поликетидсинтазного генного островка *pks*, первичными краевыми маркерами которого являются *clbB* и *clbN* (рис.3). (Здвижкова И.А. и др., 2017)

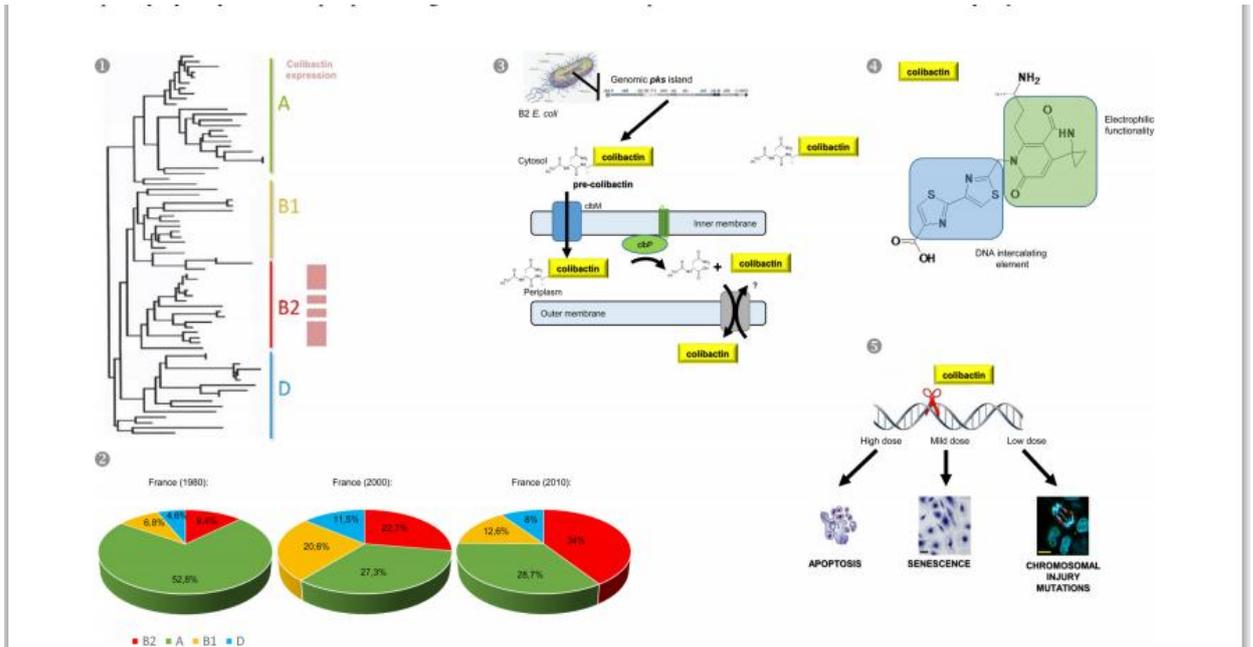


Рис.2 Распространенность колибактина, биосинтез и способ действия.

1: Филогенное древо полных геномов *E. coli*, с коллекции филогенетических групп и типы, продуцирующие колибактин (выделены красным цветом).

2: Распространенность основных филогенных групп *E. coli* во Франции между 1980 и 2010.

3: B2 *E. coli*, содержащая остров *pks*, продуцирует гибридный (s) пептид-поликетид, названный колибактином, который синтезируется как неактивная форма и нуждается в созревании в периплазме до ее экскреции.

4: Раскрыта предполагаемая химическая структура колибактина и электрофильный кластер, который может алкилировать ДНК, что приводит к двуцепочечным разрывам ДНК в эукариотических клетках.

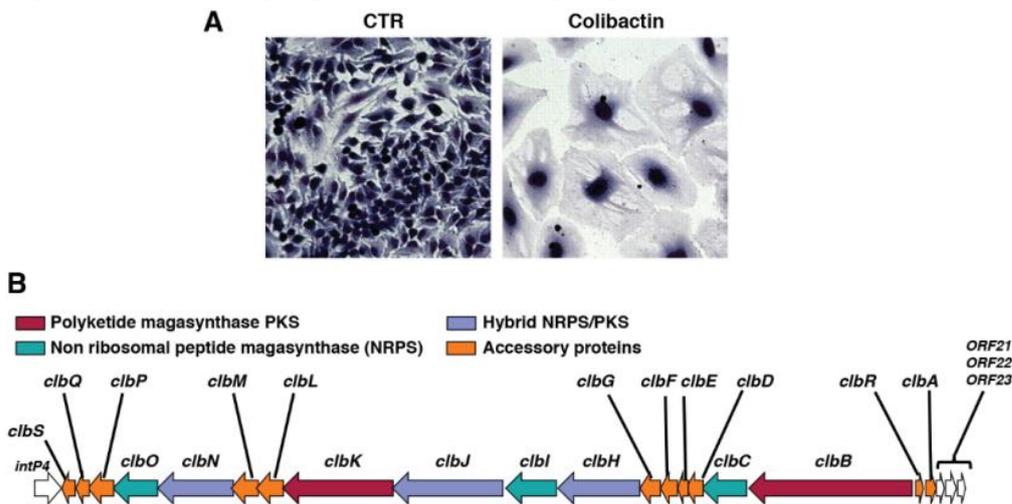


Рис.3. Влияние колибактина на клетки млекопитающих и его геномную организацию (A). Двухцепочечные разрывы ДНК в эукариотических клетках. Схематический рисунок геномного островка *pks*, который продуцирует ферменты и белки, для активного синтеза колибактина в *E. coli*. (Nougayrede,

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, 313, 848–851).

После изучения генотоксической природы колибактина было предположено, что этот метаболит может придавать канцерогенные свойства штаммам *E. coli* филогенитической группы B2. Длительная колонизация кишечника с такими генотоксическими штаммами *E.coli* может оказывать влияние на развитие опухоли и колоректальный рак (КР). КР является четвертым наиболее частым раком, с более чем одним миллионом случаев в год и третьим самым летальным во всем мире. Опухоли обычно развиваются чаще в дистальной части толстой кишки (включая нисходящую ободочную кишку и прямую кишку). Недавние исследования показали, что модификация либо качественный состав микробиоты, либо увеличение патогенной флоры кишечника, точнее дисбактериоз, наблюдаемый у больных, может быть связан с КР. Это говорит о том, что представители условно-патогенных могут участвовать в активном механизме канцерогенеза. Также выяснили, что токсические клетки проявляют признаки клеточного старения, что сопровождается увеличением продуцирования противовоспалительных медиаторов, активных форм кислорода и протеаз (рис.3). Продуцирующая колибактин *E.coli* способна увеличивать рост опухоли в ксенотрансплантатах и моделях мыши с КР, через индукцию клеточного старения. Эти данные показали новый механизм понимания канцерогенеза толстой кишки, в котором продуцирующий колибактин *E.coli*, может индуцировать стареющие клетки для получения медиаторов, которые в ответ могут стимулировать рост опухоли. Тем не менее, точное значение продуцирующего колибактин *E. coli* в КР внутри организма остается неизвестным.

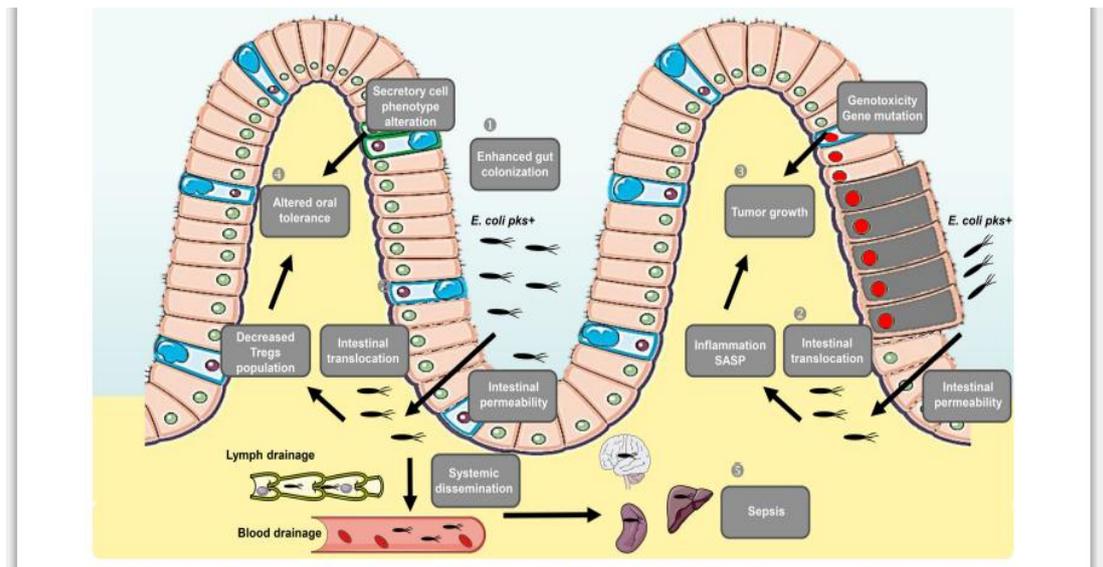


Рис.3 Схема воздействия колибактина на организм человека. Экспрессия *pks*-острова *E. coli* усиливает их свойство колонизировать кишечник хозяина (1), изменять проницаемость кишечника и увеличение бактериальной транслокации из просвета кишечника (2). Изменение иммунного состояния и гомеостаза, воспалительный ответ, индуцированный *pks E. coli*, способствует росту опухоли (3) и ухудшает толерантность (4). Системное распространение *pks E. coli* впоследствии приводит к сепсису (5).

1.7 Маркеры кишечного воспаления при заболеваниях кишечника

Одной из самых трудных проблем в гастроэнтерологической практике является диагностика и лечение неспецифического язвенного колита (НЯК) и болезни Крона (БК). Для их диагностики применяют различные методы, такие как рентгенологические, эндоскопические и морфологические. Но более эффективны в практике последние годы оказалось применение неинвазивных методов. Методикой неинвазивного определения активности воспаления у пациентов с ВЗК является тест на выделение с калом гранулоцитов, меченых меткой. Но этот метод опасен и дорогостоящий. Более эффективный маркер был выделен из гранулоцитов в 1980 году, фекальный кальпротектин (ФК). Кальпротектин относится к группе кальций-связанных белков, состоящий из одной легкой цепи и двух тяжелых. Фекальный кальпротектин обнаруживается в нейтрофилах, в меньшей степени в моноцитах и макрофагах. ФК обладает бактериостатическим и фунгицидным свойствами. При воспалении концентрация кальпротектина в крови увеличивается в 5-40 раз. У больных с воспалением кишечника концентрация ФК в 6 раз выше, чем в плазме крови и напрямую зависит от активности воспалительного процесса. Как вероятный маркер локального воспаления, ФК имеет ряд особенностей: он не подвержен воздействию протеолитических ферментов и его концентрация не изменяется даже при хранении кала в течение 7 дней. В ходе различных исследований выяснили, что ФК является надежным маркером неинвазивной диагностики ВЗК, как взрослых так и у детей. Для определения концентрации кальпротектина используют специальные тест системы ИФА. Так же ФК можно использовать в качестве маркера эндоскопической ремиссии и регенерации слизистой оболочки кишечника у пациентов с ВЗК, для определения активности заболевания он может быть параметром обострения заболевания у больных с НЯК и БК. (Татьянина О.Ф. и др., 2007)

Лактоферрин в кале – один из маркеров кишечного воспаления, антибактериальный белок с иммуномодулирующей активностью. Увеличивается в 10-100 раз при воспалениях. У пациентов, страдающих ВЗК

содержание лактоферрина составляет 75-300 мкг/г, а у здоровых людей он не превышает 1 мкг/г . Этот маркер используют для оценки активности ЯК и болезни Крона. Также для дифференциальной диагностики.

Бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость – маркер бактериальной инфекции и системного воспаления, ANCA-антиген моноцитов и гранулоцитов. Высокие концентрации обнаруживаются у пациентов с язвенным колитом, также он усиливает эффект антибактериальных препаратов.

Неоптерин – маркер воспалительных заболеваний, содержание которого повышается в сыворотке крови и моче, концентрация зависит от тяжести заболевания. Этот маркер характерен для неспецифического язвенного колита(НЯК) и болезни Крона. Повышение концентрации НП отмечается и у больных с глютен-чувствительной энтеропатией.

Секреторный IgA (sIgA) в кале - еще один маркер воспалительных процессов, sIgA состоит из двух мономеров IgA, соединенных J-цепью, также секреторным компонентом. Секреторный IgA вырабатывается плазматическими клетками в слизистых кишечника. Секреторный IgA – основной иммуноглобулин молозива ,слезной жидкости, грудного молока, слюны, гастроинтестинального секретов. Он предотвращает связывания микроорганизмов со слизистой, активации белков комплемента и воспалительных реакций. Новорожденные пассивно иммунизируются от кишечных инфекций, через грудное вскармливание, получая секреторный IgA.

1.8 Лабораторные методы исследования

Для бактериологических, серологических исследований и ПЦР диагностики эшерихиозов, различных ВЗК используют биоматериал: кал и биоптаты. Забор испражнений производится деревянным шпателем или стеклянной палочкой из лотка или судна. Забор материала должен осуществляться до лечения различными препаратами. Материал собирают сразу после дефекации, помещают в стерильные пробирки или баночки и доставляют в лабораторию в течение 2 часов для исследования. При длительной доставке материал помещают в холодильник (2-6 градуса).

Материал сеют на дифференциальные среды Эндо, Левина, Плоскирева. Также используют среды обогащения –селенитовый бульон или бульон Раппопорт, для накопления возбудителя. Чашки засевают петлей или шпателем и инкубируют при 37 в термостате 24-48 часа. Выделенные культуры идентифицируются по морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

Учет результатов проводят по выросшим колониям. На среде Эндо кишечная палочка образует выпуклые колонии малиново-красного цвета с металлическим блеском или без него. Кишечная палочка разлагает лактозу образуются кислые продукты, они восстанавливают фуксин из бесцветного соединения в красный и поэтому вырастают колонии, окрашенные в малиново-красный цвет.

Бактерии хорошо растут на простых питательных средах: мясопептонном бульоне(МПБ), мясопептонном агаре(МПА). На МПБ дают обильный рост при значительном помутнении среды, осадок небольшой, сероватого цвета. Образуют пристеночное кольцо, пленка на поверхности бульона обычно отсутствует. На МПА колонии прозрачные с серовато-голубым отливом. Отбор колоний патогенных кишечных палочек проводят с помощью ориентировочной реакции агглютинации с диагностической сывороткой. Используют смесь ОКБ – сывороток против патогенных кишечных палочек, соединяя не более 5

сывороток. Для постановки ориентировочной реакции агглютинации исследуют не менее 10 колоний. Если ни одна из них не агглютинирует, дают отрицательный ответ. Из колоний с положительной реакцией агглютинации делают посев в пробирки со средой Клиглера или скошенным агаром и ставят в термостат на 18–20 часов. Учитывают на следующий день результаты. Для идентификации культуры, нужно поставить развернутую реакцию агглютинации с живой и гретой культурой. Диагностическую типовую сыворотку разводят от 1:100 до титра сыворотки, указанного на этикетке. Из разведений приготовить два ряда пробирок. Приготовить антиген. Для этого смыть культуру с поверхности среды 3–5 мл физиологического раствора, разлить взвесью в 2 стерильные пробирки. Одну из них прогреть на водяной бане при 100°C в течение часа. В первый ряд разведений сыворотки внести по 2 капли живой культуры, во второй – по 2 капли гретой культуры. После встряхивания пробирки поместить в термостат на 18–20 часов. Учет реакции агглютинации провести с помощью лупы. Агглютинация с живой культурой крупнохлопчатая (Н-агглютинация), с убитой – мелкозернистая (О-агглютинация).

Также для идентификации используют современные методы ПЦР-диагностики (классическая ПЦР). Материалом для исследования послужит выделенная ДНК из клинического биоматериала (кал, биоптаты). ДНК выделяют с применением различных современных наборов (например, ДНК--сорб-В). Также для проведения ПЦР анализа подбираются родоспецифические праймера в генетическом банке. Вместе с праймерами подбирается режим для амплификации, подходящей исключительно им. Детекцию нужных нам фрагментов проводят в агарозном геле методом электрофареза. Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили в 1,7% агарозном геле с использованием стандартных наборов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выделение препаратов ДНК из клинического материала (кал)

Выделение препаратов ДНК из клинических материалов с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В».

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 прогрели при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2. Отобрали 54 одноразовых пробирок. Промаркировали пробирки. Выделяли из кала (1-54) образца.

3. Внесли в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора.

4. Тщательно ресуспендировали сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку добавили по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального.

5. В пробирки с лизирующим раствором и сорбентом внесли по 100 мкл проб, используя наконечники с фильтром. Пробы тщательно перемешали на вортексе и прогрели 5 мин при температуре 65 °С. Перемешали на вортексе и поставили в штатив на 2 мин.

6. Осадили сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

7. Добавили в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадили сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

8. Добавили в пробы по 900 мкл раствора для отмывки 2, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Поместили пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

10. Для элюции ДНК в пробирки добавили по 70 мкл ТЕ-буфера. Перемешали на вортексе. Поместили в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

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

2.3 Выделение ДНК из биоптатов оптимизированным методом

Оптимизированный метод выделения препаратов ДНК, заключенных 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 Е.Е. и др., 2015)

Общая схема состоит из трех этапов:

Подготовка: 1 М раствор ацетата натрия. Для этого взвесили 20,4 г CH_3COONa * $3\text{H}_2\text{O}$ и доводили дистиллированной водой до 50 мл.

1. Лизис ТПФ в растворе щелочи в присутствии детергента в течение 30 мин при температуре 95°C .

На первом 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 $\text{pH}=5,0$ до конечной концентрации 0,3 М.

2. Депарафинизация методом вымораживания.

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.

3. Осаждение ДНК этанолом.

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 Подбор и синтез специфических олигонуклеотидных праймеров

Оптимальные условия для подбора праймеров:

- Оптимальная длина праймера составляет от 18-30 нуклеотидов;
- Праймер должен иметь уникальную последовательность, находящуюся внутри матричной ДНК, которую предполагается амплифицировать;
- Праймеры не должны образовывать между собой стабильные димеры и не должны формировать шпилечные структуры;
- Различие температуры отжига между двумя праймерами должно быть минимально;
- Оптимальная температура отжига находится в диапазоне от 55°C до 70°C;
- Идеально когда праймер состоит из 20 нуклеотидов, содержит почти случайную смесь нуклеотидов и содержание GC составляет 50%.

Поиск заданной последовательности ДНК в GenBank.

1. Открыть в Интернете сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
2. В окошке Search открыть вкладку Nucleotide и ввести в поле название искомого микроорганизма, например, *Staphylococcus aureus* и осуществить поиск.
3. Скопировать данную нуклеотидную последовательность в буфер обмена и вставить в окно программы EditSeq пакета Lasergene.
- 4 Сохранить файл.

Подбор олигонуклеотидных праймеров в программе PrimerSelect

1. Для начала необходимо запустить программу PrimerSelect. Открыть меню File и выбрать Enter sequence, выбрать нужный файл с нуклеотидной последовательностью.
2. Для настройки основных характеристик праймеров и ампликонов необходимо запустить меню Conditions. В подменю Primer Characteristics можно установить желаемую температуру плавления праймеров, а так же длину и размеры шпилек и димеров. В подменю Primer Locations можно установить размер ампликона.

3. Для автоматического подбора праймеров по указанным характеристикам необходимо перейти в меню Locate и выбрать Primers&Probes.

4. Для копирования нуклеотидной последовательности праймера нужно снова открыть последовательность, используя программу EditSeq и скопировать указанные участки цепи ДНК.

2.5 Проведение ПЦР - анализа препаратов ДНК *E.coli* на выявление гена колибактина

1.Разморозили Таq-буфер, dNTP, растворы праймеров и ресуспендировали на вортексе. Под воздействием положительной температуры Таq-полимераза начинает разрушаться, поэтому ее необходимо держать в морозильнике и при выполнении работы в холодном штативе.

2.Отобрали 54 одноразовых пробирок. Промаркировали. Расположили на штативе в определенном порядке. Постановку ПЦР осуществляли с образцами, полученных от больных пациентов : биоптаты(1-50) и образцы кала(1-54).

3.Рассчитали и приготовили амплификационную смесь для общего количества проб в пробирке на 1,5 мл и внесли в каждую пробирку по 22 мкл. Общий объем 25 мкл.

4.Состав реакционной смеси для 1 пробирки:

mQ - 16 мкл

Таq- буфер - 2,5 мкл

dNTP - 2,5 мкл

Таq-полимераза - 1 мкл

5.В каждую пробирку внесли сначала праймер (F) по 1 мкл, затем праймер (R) по 1 мкл.

6.Используя отдельный наконечник с фильтром, внесли в каждую пробирку по 1 мкл исследуемого образца ДНК.

7.Во избежание испарения реакционной смеси во время амплификации, добавляли в каждую пробирку по одной капле масла.

8.Закрытые пробирки центрифугировали на вортексе.

9.Пробирки установили в ячейки амплификатора и запустили необходимую программу со следующим температурным режимом амплификации:

- | | | |
|-----|-----------------------------------|-------------|
| I. | Денатурация: 95°C - 5 мин, 1 цикл | |
| II. | Денатурация: 95°C - 45 сек | } 35 циклов |
| | Отжиг: 56 °C - 45 сек | |
| | Элонгация: 72 °C - 45 сек | |

Ш. Достаивание цепей ДНК: 72°C -10 мин, 1 цикл

10.Провели амплификацию.

2.6 Электрофоретическое разделение ПЦР продуктов препаратов ДНК в агарозном геле

Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили в 1,7% агарозном геле с использованием стандартных наборов.

Электрофорез в агарозном геле проводили по следующей схеме:

1. Готовили 1 л 5х-ного ТАЕ буфера. Для этого к 100 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавляли 900 мл дистиллированной воды. Перемешивали.

2. Взвешивали 1,7 г агарозы. К 1,7 г агарозы добавляли 100 мл 5х-ного ТАЕ буфера, перемешивали. Полученную смесь расплавляли в микроволновой печи в течение 2-3 минут, периодически перемешивая, довели до кипения. Полученная смесь должна быть прозрачной, без крупинок. Затем дали смеси остыть до 50-60°C.

3. Разливали агарозу по 25 мл в специальную форму с двумя гребенками. Дали гелю застыть в течение 25-30 минут. Толщина геля не должна была быть менее 2 мм, но не более 5 мм.

4. После застывания геля, аккуратно удалили гребенки.

5. В камеру для электрофореза наливали необходимое количество 5х-ного ТАЕ буфера и помещали в него гель. Буфер должен был полностью покрывать гель сверху на 2-10мм.

6. В каждую пробирку с амплификатом добавляли по 4 мкл красителя и откручивали на вортексе.

7. Наносили по 10 мкл каждого образца в лунки. Исследовали 20 проб.

8. Подключали клеммы прибора к источнику питания, так что бы на старте находился (-), а на финише (+). Запустили электрофорез, используя источник питания (Эльф-4, ДНК-Технология) с заданными параметрами: сила тока 400 мА, мощность 80 Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно было быть больше, чем на финише. Визуально по движению полосы красителя осуществляли контроль за электрофоретическим разделением.

9. Электрофоретическое разделение проводили в течение 25 минут, затем вынимали гель из формы и помещали в специальную плашку для окрашивания. Наливали в плашку раствор бромистого этидия и окрашивали в течение 2-3 минут.

10. Сливали краситель обратно в колбу. Гель промывали под проточной водой. Помещали его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включили прибор и проанализировали результаты исследования. Сфотографировали гель при помощи цифрового фотоаппарата и сохранили фотографию.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В сочетании с целью и задачами исследования нами было проведено микробиологическое обследование 54 больных, поступивших в проктологическое отделение Уфимской №21 городской клинической больницы и 50 образцов биоптата, полученных из патологоанатомического отделения.

С целью изучения состояния микробного биоценоза толстого кишечника нами было обследовано 54 больных с воспалительными заболеваниями толстого кишечника и 50 биоптатов.

Исследование пристеночной микрофлоры толстого кишечника осуществлялось на основании изучения биоптатов и кала, Был осуществлён бактериологический анализ 50 биоптатов и 54 образца кала, полученных от больных ВЗК толстого кишечника.

Геномную ДНК из материала выделяли с применением набора «ДНК-сорб Б» и для сравнения применили оптимизированный метод выделения ДНК для биоптатов, заключенных в парафин.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Терцик-МС2». Детекция результатов осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле в буфере TBE, с последующей визуализации результатов в трансиллюминаторе .

3.1 Подбор оптимальных праймеров для ПЦР-идентификации *E.coli* гена колибактина

Для подбора праймеров был использован ресурс GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), проводили поиск сходных последовательностей по всей базе данных генов с помощью программы PrimerSelect из пакета программ фирмы DNASTar («DNASTAR, Inc.», США). Окончательно определившись с нуклеотидными последовательностями, приступили к подбору оптимальных для ПЦР-диагностики праймеров. Использовали такие критерии отбора праймеров, как полное отсутствие димеров и шпилек праймеров, длина амплифицируемого участка от 200 п.н. до 1000 п.н.,

температура отжига более 53⁰С. А также для подбора пары олигонуклеотидных праймеров, использовались следующие требования:

- оптимальные праймеры не должны образовывать между собой стабильные димеры и не должны формировать шпилечные структуры;
- желательно, чтобы температура отжига была больше 55⁰С, но меньше 70⁰С;
- 3'-конец праймера размером около 10 нуклеотидов должен быть абсолютно комплементарен цепи ДНК;
- разница в температурах отжига между двумя праймерами должна быть минимальной;
- длина праймера от 18 до 30 нуклеотидов.

В результате проделанной работы были подобраны праймеры для амплификации *E.coli* ген колибактин.: *Clb-F* 5'-GCGCATCCT CAAGAGAAATA-3' и *Clb-R* 5'-GCGCTCTATGCTCATCAACC-3' (рис.1.) . Здесь расчетная температура отжига составила 56⁰С, а размер ампликона 280 п.н. (табл.1).

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
<i>Clb-F</i>	5' – GCGCATCCT CAAGAGAAATA -3'	56 ⁰ С	280
<i>Clb-R</i>	5' – GCGCTCTATGCTCATCAACC -3'		

```

ORIGIN
  1 gataaccgga aagtgcagca ccatagcgat agtaataagt ctgttcgaag gggtaatccg
  61 gcaatggaat gtgcttgccg agtgccgtct ggtaaagcg tctccaatca atattctccc
 121 ccctgaccca cagcgccgcc agcgtacgat gcaacatgtg ctcatcatcg atcgccgctg
 181 tggctttgcg tagcgtcaac agggctcggct gatcgctgta ttggttatgt ccttgaataa
 241 aggtagagag cgtattaccc ggcccacatt cgataaacag cgtgggttgt accaacagtt
 301 gcgccgcacc ttcgctaac agcaccgctg tgcgcacttg ctgcaccagc taatccggcg
 361 aggtagcttg ctccctcagta atccatgtac cgcttacatt agatataaag cgcttggtcg
 421 gcgctgcat cgggatttgc cccagcaact gtgcaaaatc gtgcagcatc ggctcatca
 481 tggcc

```

//

Рис.1 Родоспецифичный праймер

3.2 Анализ обнаружения гена колибактина в *E.coli* исследуемом клиническом материале

В качестве клинического материала были использованы фекалии больных и биоптаты. При этом выделяли тотальную ДНК из материала, объемом не больше 200 мкл. В связи с этим, необходимо отметить, что даже при наличии тех или иных микроорганизмов в клиническом материале, они могли быть не идентифицированы.

В исследуемых образцах кала и биоптата, ген колибактин *E.coli* обнаружен не был (рис.2). Проанализировав свои отрицательные результаты мы выделили следующие причины:

1. Данный ген встречается не у всех штаммов филогенетических групп *E.coli*. Филогенетическая группа B2 *E. coli* несет в своем геноме кластер-гена *rks*, который ответственный за синтез колибактина (рис.3). Только 30% штаммов *E. coli* группы B2 переносят в своем геноме кластер *rks*-гена. Схема распределения островка *rks* обнаруживает полное ограничение на филогенетическую группу B2. Филогенетическая группа B2 рано сформировавшаяся группа, но не широко распространена и продолжает расти. (Thomas Secher et al.,2016)

2. При использовании в качестве материала испражнений, конечные результаты могли быть искажены от чрезмерной обсемененности сопутствующей бактериальной флорой, наличие билирубина, желчных кислот, мочевины, гепарина. (Olive D.M, 1989)

3. При исследовании биоптатов в качестве отрицательно влияющих на ход реакции рассматриваются используемые для консервации и фиксации ртульсодержащие соединения, нейтральный забуференный формалин и рибонуклеат ванадия. Биоптаты заключенные в парафин, предварительно проходят физическую и химическую (батарея спиртов, формалин) обработку, что могло послужить разрушению ДНК. (Fiallo P. Et al., 1992)

- 4.Ингибирование полимеразной цепной реакции также могло повлиять на результаты. Ингибирование связанное с неэффективной пробоподготовкой

материала преимущественно связывают с объективными ограничениями всех применяемых в настоящее время методов лизиса. В частности низкая эффективность ПЦР может определяться образованием сложных комплексов ДНК-белок. Еще могут влиять неудовлетворительные условия хранения и высокая чувствительность первичной структуры ДНК к гидролизу. (Wilson I.G. et al.,1994)

Распространенность штаммов филогенетической группы B2 кишечной палочки довольно невысока, что затрудняет результаты. Также островки патогенности *rks*, ответственные за синтез колибактина, были обнаружены не только в кишечной палочки, но и в *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и изолятов *Citrobacter koseri*.(Johannes Putze et al.,2009). Что позволяет расширить исследования этого гена, обнаруженные у других видов бактерий.

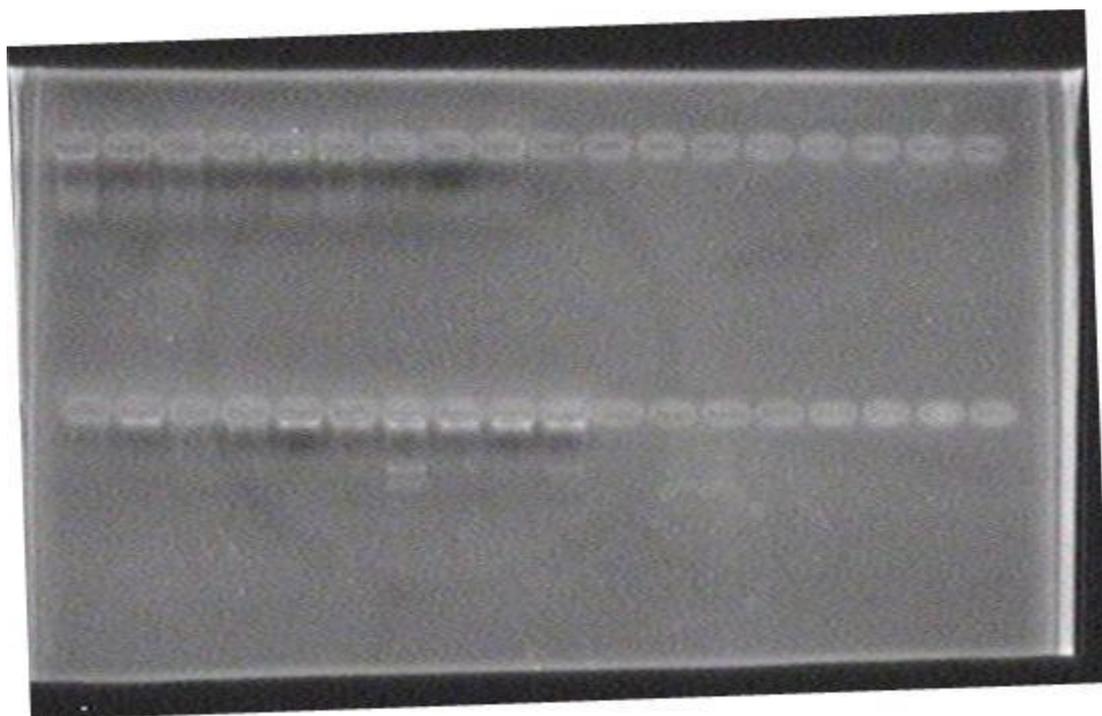


Рис.2– Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК гена колибактина в *E.coli*.: 1-19 – ДНК исследуемых образцов; 20 - отрицательный контроль

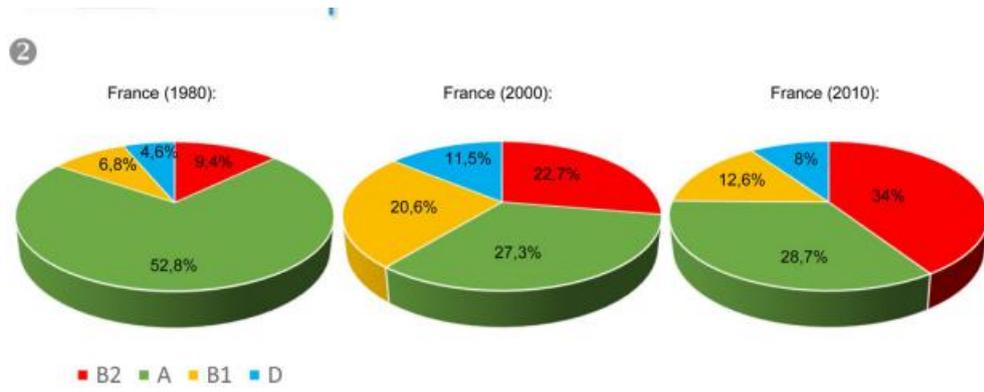


Рис.3 Распространенность основных филогенных групп *E. coli* во Франции между 1980 и 2010.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение генома кишечной палочки вызывает большой интерес у исследователей, главным образом, в связи с тем что, имеющиеся острова гентоксичности *rks* у *E.coli* могут синтезировать ген колибактин, который обладает канцерогенными свойствами и может вызывать рак толстой кишки.

До 90% в человеческой популяции колонизирует кишечная палочка, она остается преобладающим аэробным организмом в кишечнике. *E. coli* достигла плотности выше 10⁹ КОЕ на грамм фекалий. После 2 лет жизни популяция *E.coli* стабилизируется примерно в 10⁷-10⁸ КОЕ в толстой кишке и в меньшей степени подвздошной кишке (10³-10⁵ КОЕ) до постепенного снижения у пожилых людей. Помимо этих безвредных штаммов комменсалов, семейство *E. coli* также содержит высоко патогенные (например, ИРЕС, кишечные патогенные *E. coli*) и экстраинтестинальные патогенные (например, ехРЕС, экстра-кишечные патогенные штаммы *E.coli*), ответственные за смерть более чем 2 миллионов людей в год. Колибактин является тонкой гранью между комменсалами и патогенными видами. Геном ядра кишечной палочки был обогащен благодаря многочисленным мобильным генетическим элементам и включал в себя плазмиды, фаги, геномные острова. Анализ генов, присутствующих в ядре-геноме, выявил пять основных филогенетических групп, классифицированных как А, В1, В2, D и Е. В то время как группа А включает в основном непатогенные штаммы, группа В2 включает как условно-патогенные, так и патогенные штаммы. Группа В2 рано появилась в филогенетическом дереве *E. coli*, до 30% штаммов группы В2 переносят в своем геноме кластер *rks*-гена.

В виду этого, в рамках данной работы мы изучали процессы образования токсинов *E.coli* и воздействия токсических продуктов на организм, так как путем идентификации и изучения бактериальных генов, возможно, разработать раннюю диагностику рака толстой кишки и соответствующую антибактериальную терапию.

В нашем исследовании мы рассмотрели несколько факторов генетической регуляции гена колибактина. Также был произведен подбор специфичных праймеров, с помощью которых была проведена амплификации ДНК гена колибактина. Были получены отрицательные результаты. Проанализировав отрицательные результаты выделены несколько причин:

1. Низкая распространенность штаммов группы B2 *E.coli*.
2. Чрезмерная концентрация сопутствующей флоры и наличие различных метаболитов в биоматериале (кал).
3. Условия хранения и обработки биоматериала (биоптат).
4. Ингибирование ПЦР.

Островки патогенности *rks*, ответственные за синтез колибактина были обнаружены не только в кишечной палочки, но и в *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и изолятов *Citrobacter koseri*. (Johannes Putze et al., 2009) Обнаружение генов колибактина связанный с горизонтальным переносом в нескольких энтеробактериях, дает новое представление о распространении этого гена кластера и его предполагаемого способа передачи. Что позволяет расширить исследования этого гена, обнаруженные у других видов бактерий .

ВЫВОДЫ

1. Сравнительное изучение различных штаммов *E. coli*, входящих в состав микрофлоры кишечника у больных с ВЗК, показало, что не все штаммы обладают генотоксичностью. Характерной токсичностью обладает лишь филогенетическая группа В 2.
2. Анализ генов, присутствующих в ядре-геноме, выявил пять основных филогенетических групп, классифицированных как А, В1, В2, D и Е. До 30% штаммов группы В2 переносят в своем геноме кластер *rks* островок.
3. Колибактин оказывает сильное воздействие на иммунитет организма, проницаемость кишечника, вирулентность и влияет на развитие коллатерального рака. Изучение биологической активности колибактина представляет особый интерес для понимания его воздействия на микрофлору и организм в целом. Это может привести к разработке адаптированных терапевтических препаратов. Также может помочь нам пересмотреть безвредность кишечных штаммов, которые считались непатогенными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В.А. Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта/ Александров В.А.// Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта. — Методическое пособие. — Санкт 2006
2. Ануфриева РГ. Оценка колонизационной резистентности кишечника с использованием индикаторных микроорганизмов / Р.Г. Ануфриева // Антибиотики и микроэкология человека и животных. - М., 1988. - С. 86-88.
3. Аруин Л.И. Эндокринные клетки желудочно-кишечного тракта / Л.И. Аруин, И.В. Зверков, В.А. Виноградов // Клин, медицина. -1987. - № 6. - С. 22-31.
4. Ашмарин И.П. Статистические методы в бактериологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. - Л.: Медицина. -1969. -180 с.
5. Бабин В.Н., Домарадский И.В. Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры // электрон. версия Российского химического журнала. – 2006. – №6. – Режим доступа: <http://www.domaradsky.ru/rhg94.htm> (17 сент.2008).
6. Бабин В.Н., Минушкин О.Н., Дубинин А.В. Молекулярные аспекты симбиоза в системе хозяин-микрофлора // Российский журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 1998. – № 6. – С.7682.
7. Белобородова Н.В. О микрофлоре хозяина и ее участии в ответе на инфекцию // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 9. – С.4448
8. Белоусова Е. А. Дисбактериоз кишечника/ Комаров Ф. И., Рапопорт С. И. // Руководство по гастроэнтерологии. М.; 2010: 310—341.
9. Бээр С.А. Роль человеческого фактора в эволюции паразитарных систем // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 1993. – № 5. – С.5056. 8.
- Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. Особи, популяции и сообщества: в 2 т. – М.: Мир, 1989. – Т. 1. – 667 с.; Т. 2. – 477 с.
10. Бондаренко В.М. Микрофлора человека: норма и патология // электронная версия научноинформационного журнала «Наука в России». – 2007. – № 1.

- 11.Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбак териозы кишечника у взрослых. – М.: Медицина, 2003. – 224 с.
- 12.Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры // Вестник РАМН. – 1997. – № 3. – С.710.
- 13.Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. – М: Медицинская книга, 2001. – 304
- 14.Воробьев А.А., Лыкова Е.А. Бактерии нормальной мик рофлоры: биологические свойства и защитные функции // ЖМЭИ. – 1999. – № 6. – С.102105.
- 15.Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины // Вестник РАМН. – 1997. – № 3. – С.47.
- 16.Воробьев А.А. Идеи Луи Пастера и развитие инфекто логии и иммунологии // Вестник РАМН. – 1996. – № 6. – С.611.
- 17.Воробьев А.А., Гинцбург А.Л., Бондаренко В.М. Мир мик робов // Вестник РАМН. – 2000. – № 11. – С.1114/
- 18.Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий // ЖМЭИ. – 2003. – № 5. – С.8693.
- 19.Гончарова Г.И., Семенова Л.П., Лянная А.М., Козлова Э.П. Бифидофлора человека, ее нормализующие и за щитные функции // Антибиотики и мед. биотехноло гия. – 1987. – Т. 32, № 3. – С.2528.
- 20.Домарадский И.В., Хохоев Т.Х., Кондракова О.А. и др. Противоречивая микроэкология // Росс. химический журнал. – 2002. – Т. 46, № 3. – С.8089.
- 21.Иванова В.В., Корнева Е.А. Закономерности взаимоотношений макроорганизма и возбудителей инфекционных болезней у детей // Вестник РАМН. – 2000. – № 11. – С.3540.
- 22.Колганова Т.В., Ермолаев А.В., Дойл Р.Дж. Влияние ферментов аспарагиназы и полифенолоксидазы на адгезивные свойства микроорганизмов // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2004. – № 3. – С.2431.

23. Костюк О.П., Чернышова Л.И., Волоха А.П. Физиологические и терапевтические свойства лактобактерий // Педиатрия. – 1998. – № 5. – С.7176.
24. Куваева И.Б., Кузнецова Г.Г. Антагонистическая активность микробных популяций защитной флоры и ее связь с характеристикой микробиоценоза и факторами питания // Вопросы питания. – 1993. – № 3. – С.4650.
25. 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: 44–52.
26. Olive D.M. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. J. Clin. Microbiol. 1989, 27:261–265.
27. Fiallo P., Williams D.L., Chan G.P., Gillis T.P. Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. J. Clin. Microbiol. 1992, 30: 3095–3098.
28. Thomas Secher, Camille Brehin, and Eric Oswald . Early settlers: which E. coli strains do you not want at birth? Mini-Review, 2016.
29. Putze, J.; Hennequin, C.; Nougayrède, 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, 77, 4696–4703.
30. Wilson I.G., Cooper J.E., Gilmour A. Some factors inhibiting amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 (*sec 1*) by PCR. Int.J.Food Microbiol. 1994, 22: 55–62.
31. Olier, M.; Marcq, I.; Salvador-Cartier, C.; Secher, T.; Dobrindt, U.; Boury, M.; Bacquié, V.; Pénary, M.; Gaultier, E.; Nougayrède, J.-P.; et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. Gut Microbes 2012, 3, 501–509.

32. Faïß, T.; Cougnoux, A.; Dalmasso, G.; Laurent, F.; Delmas, J.; Bonnet, R. Antibiotic Activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60, 6986–6988.
33. Vizcaino, M.I.; Engel, P.; Trautman, E.; Crawford, J.M. Comparative metabolomics and structural characterizations illuminate colibactin pathway-dependent small molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 9244–9247.
34. Pérez-Berezo, T.; 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, 8, 1314.
35. 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, 13, 269–284.
36. Sarff, L.D.; McCracken, G.H.; Schiffer, M.S.; Glode, M.P.; Robbins, J.B.; Orskov, I.; Orskov, F. Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. *Lancet* 1975, 1, 1099–1104.
37. Clermont, O.; Christenson, J.K.; Denamur, E.; Gordon, D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013, 5, 58–65.
38. Escobar-Páramo, P.; Clermont, O.; Blanc-Potard, A.-B.; Bui, H.; Le Bouguéneç, C.; Denamur, E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 2004, 21, 1085–1094.
39. Raisch, J.; Buc, E.; Bonnet, M.; Sauvanet, P.; Vazelle, E.; de Vallée, A.; Déchelotte, P.; Darcha, C.; Pezet, D.; Bonnet, R.; et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 6560–6572.
40. Tenailon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 207–217.

41. Lai, Y.-C.; Lin, A.-C.; Chiang, M.-K.; Dai, Y.-H.; Hsu, C.-C.; Lu, M.-C.; Liao, C.-Y.; Chen, Y.-T. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE* 2014, 9, e96292.
42. Fung, C.P.; Hu, B.S.; Chang, F.Y.; Lee, S.C.; Kuo, B.I.; Ho, M.; Siu, L.K.; Liu, C.Y. A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. *J. Infect. Dis.* 2000, 181, 2075–2079.
43. Thompson, W.; Romance, L.; Bialkowska-Hobrazanska, H.; Rennie, R.P.; Ashton, F.; Nicolle, L.E. *Klebsiella pneumoniae* infection on a rehabilitation unit: comparison of epidemiologic typing methods. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1993, 14, 203–210.
44. Chen, Y.-T.; Lai, Y.-C.; Tan, M.-C.; Hsieh, L.-Y.; Wang, J.-T.; Shiao, Y.-R.; Wang, H.-Y.; Lin, A.-C.; Lai, J.-F.; Huang, I.-W.; et al. Prevalence and characteristics of pks genotoxin gene cluster-positive clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan. *Sci. Rep.* 2017, 7, 43120.
45. Bian, X.; Fu, J.; Plaza, A.; Herrmann, J.; Pistorius, D.; Stewart, A.F.; Zhang, Y.; Müller, R. In vivo evidence for a prodrug activation mechanism during colibactin maturation. *Chembiochem* 2013, 14, 1194–1197.
46. Brotherton, C.A.; Balskus, E.P. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 3359–3362.
47. Martin, P.; Marcq, I.; Magistro, G.; Penary, M.; Garcie, C.; Payros, D.; Boury, M.; Olier, M.; Nougayrède, J.-P.; Audebert, M.; et al. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 2013, 9, e1003437.
48. Zha, L.; Wilson, M.R.; Brotherton, C.A.; Balskus, E.P. Characterization of Polyketide Synthase Machinery from the pks Island Facilitates Isolation of a Candidate Precolibactin. *ACS Chem. Biol.* 2016, 11, 1287–1295.
49. Guntaka, N.S.; Healy, A.R.; Crawford, J.M.; Herzon, S.B.; Bruner, S.D. Structure and Functional Analysis of ClbQ, an Unusual Intermediate-Releasing

- Thioesterase from the Colibactin Biosynthetic Pathway. *ACS Chem. Biol.* 2017.
50. Mousa, J.J.; Yang, Y.; Tomkovich, S.; Shima, A.; Newsome, R.C.; Tripathi, P.; Oswald, E.; Bruner, S.D.; Jobin, C. MATE transport of the *E. coli*-derived genotoxin colibactin. *Nat. Microbiol.* 2016, 1, 15009.
51. Li, Z.-R.; Li, Y.; Lai, J.Y.H.; Tang, J.; Wang, B.; Lu, L.; Zhu, G.; Wu, X.; Xu, Y.; Qian, P.-Y. Critical Intermediates Reveal New Biosynthetic Events in the Enigmatic Colibactin Pathway. *Chembiochem* 2015, 16, 1715–1719.

ПРИЛОЖЕНИЯ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

*Бижбаева Л.О., Хакимова Л.Р., Таймуллина Э.Д., Зигангирова Н.Н.,
Юсуповичева Э.К.*
ЗА ЛУЧШИЙ УСТНЫЙ ДОКЛАД СРЕДИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

НА СЕКЦИИ

«Биология, микробиология, физика»

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *д.м.н., профессор А.Р. Мавзютов*

83-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ

МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

[Подпись]
В.Н.Павлов

Сертификат

Юмагужина Гульнара Камилевна

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018
High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РНФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич





Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

vestnikbgmu.ru

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

Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

приложение №3, 2018 г.

Редакционная коллегия:

Главный редактор: чл.-корр. РАН, проф. Павлов В.Н. – ректор Башкирского государственного медицинского университета (Уфа)

Зам. главного редактора: проф. Нартайлаков М.А. (Уфа)

Члены редакционной коллегии: проф. Катаев В.А. (Уфа); проф. Ахмадеева Л.Р. (Уфа); доц. Цыглин А.А. (Уфа); проф. Галимов О.В. (Уфа); проф. Загидуллин Н.Ш. (Уфа); проф. Малиевский В.А. (Уфа); доц. Стрижков А.Е. (Уфа); проф. Еникеев Д.А. (Уфа); доц. Гончаров А.В. (Уфа); проф. Мавзютов А.Р. (Уфа); проф. Гильманов А.Ж. (Уфа); проф. Минасов Б.Ш. (Уфа); проф. Викторова Т.В. (Уфа); проф. Валишин Д.А. (Уфа); проф. Сахаутдинова И.В. (Уфа); проф. Садригдинов М.А. (Уфа); проф. Новикова Л.Б. (Уфа); проф. Верзакова И.В. (Уфа); проф. Моругова Т.В. (Уфа); проф. Гильмутдинова Л.Т. (Уфа).

Редакционный совет:

Чл.-корр. РАН, проф. Тимербулатов В.М. (Уфа), проф. Бакиров А.А. (Уфа), проф. Ганцев Ш.Х. (Уфа), доц. Шебаев Г.А. (Уфа), проф. Мулдашев Э.Р. (Уфа), проф. Викторов В.В. (Уфа), проф. Кубышкин В.А. (Москва), проф. Гальперин Э.И. (Москва), проф. Вишневецкий В.А. (Москва), чл.-корр. РАМН, проф. Аляев Ю.Г. (Москва), чл.-корр. РАМН, проф. Чучалин А.Г. (Москва), чл.-корр. РАМН, проф. Долгушин И.И. (Челябинск), чл.-корр. РАМН, проф. Котельников Г.П. (Самара), проф. Созинов А.С. (Казань).

Состав редакции сетевого издания «Вестник Башкирского государственного медицинского университета»:

зав. редакцией – к.м.н. Кашев М.Ш.
ответственный секретарь – к.м.н. Рыбалко Д.Ю.
научный редактор – к.фарм.н. Фаизуллина Р.Р.
технический редактор – к.м.н. Насибуллин И.М.
художественный редактор – доц. Захарченко В.Д.
технический секретарь редакции - Зиятдинов Р.Р.
корректор – Брагина Н.А.
корректор-переводчик – к.ф.и. Майорова О.А.

ЗАРЕГИСТРИРОВАН В ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЕ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ СВЯЗИ, ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
И МАССОВЫХ КОММУНИКАЦИЙ 26.07.2013, НОМЕР СВИДЕТЕЛЬСТВА ЭЛ № ФС 77 - 54965.

© ФГБОУ ВО БГМУ МЕДИЦИНА РОССИИ, 2018

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНА <i>GSTP</i> ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1102
М.В. Курилов, Д.О. Каримов, Н.Ю. Хуснутдинова, Р.А. Даукаев	
МЕТАБОЛИЗМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ КОНСЕРВАНТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	1107
КутлинаТ.Г. ¹ , ВаловаЯ.В. ^{1,2} , КаримовД.О. ¹ , МухаммадиеваГ.Ф. ¹ , ХуснутдиноваН.Ю. ¹	
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>GSTT</i> ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1112
А. Р. Муллабаева	
СТРЕПТОКОККИ КАК ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ ОЧАГОВОЙ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ.....	1117
Э.Н. Усманова, А.С. Фазлыева, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1122
А.С. Фазлыева, Э.Н. Усманова, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1127
И.А. Янтура, К.А. Сазонова, Е.Ш. Зулкарнаева	
СРАВНЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1132
Э.Ф. Бердигулова	
К ВОПРОСУ О РОЛИ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И СРЕДЫ В ПРОЯВЛЕНИИ НАРКОЛЕПСИИ.....	1137
К.Ю. Швец ¹ , А.Р. Бахтиева ² , А.Т. Загафуранова ² , А.Д. Дворенкова ² , Е.В. Третьякова ²	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.....	1142
Е. Ш. Зулкарнаева, К. А. Фархутдинова, И. А. Янтура	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ, СПИРТОВЫХ И ГЕКСАНОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ВОДЯНОГО ОРЕХА <i>TRAPASIBIRICA</i> И ДРУГИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ.....	1147
Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина, Э.Д. Гайнуллина, Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова	
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ «ОСТРОВОВ» ГЕНОТОКСИЧНОСТИ <i>RKS+ESCHERICHIACOLI</i> ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА.....	1152
А.А. Трушнова, П.Е. Базарова	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ В ОБРАЗЦАХ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЁМОВ ГОРОДА УФЫ.....	1157
Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова, Э.Д. Гайнуллина, Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина	
БАКТЕРИИ РОДА <i>SAMPYLOVASTEA</i> И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ.....	1160
Д. Ю. Анпилогова	

Актуальность. В настоящее время актуальным направлением в исследовании рака толстой кишки является изучение влияния симбиотических микроорганизмов и закономерностей организации этих сообществ [1]. Это связано с тем, что основные представители микробиоты кишечника человека, например, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, обладая целым арсеналом факторов вирулентности, могут критично изменять жизнедеятельность и клеточный цикл энтероцитов [5-7].

Показано, что патогенный потенциал даже такого классического комменсала, как *Escherichia coli*, может существенно изменяться ввиду исключительной пластичности их генома [8]. Указанное связывают с мутациями и/или наличием у этих бактерий целого ряда мобильных генетических элементов, таких как бактериофаги или плазмиды [4,9,12,13]. Однако безусловными лидерами в плане реализации геномной патогенетически значимой пластичности *E. coli* являются «островки» или «острова патогенности», содержащие от одного до нескольких десятков генов, кодирующих факторы патогенности и обеспечивающих внутривидовую и межвидовую передачу с последующим часто кардинальным изменением вирулентности представителей семейства *Enterobacteriaceae* [2,3].

В этой связи огромный научно-практический интерес представляют данные о том, что некоторые штаммы *E. coli* несут генетический кластер поликетидсинтазы (*pks*). С ним связывают кодирование мультиферментативного механизма, ответственного за синтез генотоксического вещества, называемого колибактином. Колибактин на фоне воспаления, вызванного *E. coli*, повреждает ДНК энтероцитов и может вызывать клеточное старение или рак [10]. Островки генотоксичности являются маркерами того, что *E. coli* является одной из причин развития рака толстой кишки.

Цель исследования. Выявить частоту встречаемости фрагментов генов «островов» патогенности (*pks*) в клиническом материале при воспалительных заболеваниях кишечника неустановленной этиологии.

Материалы и методы. Объектами исследования в данной работе послужили 54 образца кала от пациентов с патологией ЖКТ. Тотальную ДНК выделяли, используя набор для выделения «ДНК-сорб-В». Затем проводили амплификацию участков ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Терцик МС2 («ДНК-Технология», Россия). Выделенная тотальная ДНК была амплифицирована с помощью известных праймеров, взятых из статьи [10]. Детекцию амплифицированных фрагментов ДНК осуществляли методом агарозного гель-электрофореза и фотографировали на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США).

Результаты и обсуждение. Методом ПЦР были исследованы клинические образцы больных с патологией ЖКТ на наличие «островов» генотоксичности *pks*, кодирующий мультиферментативный механизм, производящий генотоксическое вещество – колибактин.

Фрагменты гена *pks* были обнаружены в 13 % случаев (рис.1).

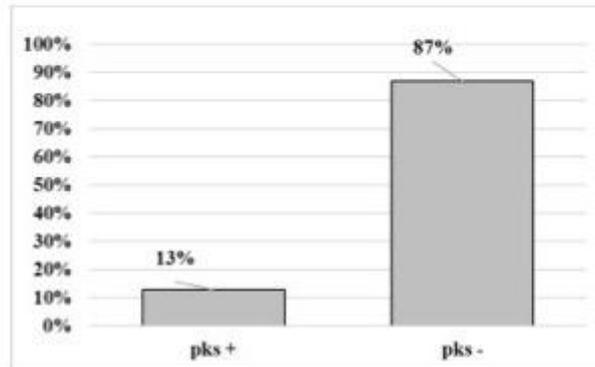


Рис.1. Частота встречаемости фрагмента *pks* у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

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 *pksE. coli* обнаруживается только в клинических образцах, взятых у пациентов с диагнозом дисбактериоз. Это может говорить о более тяжелом течении заболевания у таких пациентов.

Вывод. Обнаружение фрагмента гена «островка» патогенности *pksE. coli* в клиническом образце не исключает риска развития рака толстой кишки.

Список литературы:

1. 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.
2. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Долгих В.В., Ракова Е.Б., Бухарова Е.В. Детекция некоторых генов, кодирующих факторы патогенности у типичных изолятов *Escherichiacoli*. // Бюллетень ВШНЦ СО РАМН. - 2014. – Т.5, №99.- С. 89-94.
3. Мавзютов А.Р., Филкина С.В., Бондаренко В.М. "Острова" патогенности условнопатогенных энтеробактерий. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2002.- № 6.- С.5-9.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. // *Nature Reviews Microbiology*.– 2010.– Vol. 8.– P. 26-38.
10. 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
11. Holmes B. Bacteria make major evolutionary shift in the lab. // *New Scientist*.- 2008.– P.1192-1205.
12. Ochman H., Lawrence J. G., Groisman E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. // *Nature*.– 2000.– Vol. 405.– P. 299-304.

УДК 616.345:579.84

**Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова, Э.Д. Гайнуллина, Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагузина
БАКТЕРИИ РОДА *CAMPYLOBACTER* И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ**

Научный руководитель – д.м.н., профессор А.Р. Мавзютов

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии,

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Резюме. Подобраны родоспецифические праймеры на консервативные последовательности генов 16S рРНК *Campylobacter*spp. Проведена амплификация ДНК, выделенной из образцов пациентов с неспецифическим язвенным колитом. В 100% образцов получены положительные результаты ПЦР, что не исключает этиологического значения *Campylobacter*spp. при неспецифическом язвенном колите.

Ключевые слова: колит, ПЦР, *Campylobacter*spp.

**L.O. Bizhbalova, L.R. KHakimova, E.D. Gaynullina, N.N. Zigangirova, G.K. YUmaguzhina
BACTERIA OF THE GENUS *CAMPYLOBACTER* AND NONSPECIFIC ULCERATIVE
COLITIS**

Scientific Advisor — MD, Full professor A.R.Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology

Bashkir State Medical University, Ufa

Summary. Genus-specific primers were selected for conservative sequences of *Campylobacter* spp. 16S rRNA genes. Amplification of DNA isolated from samples of patients with ulcerative colitis was carried out. In 100% of the samples, positive PCR results were obtained, which does not exclude the etiological significance of *Campylobacter* spp. with nonspecific ulcerative colitis.

Keywords: colitis, PCR, *Campylobacter* spp.

Актуальность. Неспецифический язвенный колит (НЯК) является одной из наиболее сложных проблем современной гастроэнтерологии и колопроктологии [3]. В патогенезе заболевания предполагается значение изменений иммунологической реактивности, дисбиотических сдвигов, аллергических реакций, генетических факторов, невро-психических нарушений. [4].

Высоко вероятной причиной воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) рассматривают микроорганизмы. При ВЗК не исключается значение *Mycobacterium avium*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter concisus*, а также вирусов, например, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барра и вируса кори. [2]. Микроорганизмы могут инициировать аутоиммунные поражения ткани кишечника [1]. При этом ввиду высокой подвижности, способности к инвазии и к инициированию аутоиммунных реакций основная роль в этиологии ВЗК может принадлежать бактериям рода *Campylobacter* [6], что было показано на родственниках им *Helicobacter pylori* [5]. Однако единого мнения среди исследователей на сей счёт нет, поскольку обнаружение *Campylobacterspp.*, например, культуральным методом крайне сложная лабораторная задача.

Цель исследования. Разработка способа молекулярно-генетической детекции бактерий рода *Campylobacterspp.*

Материалы и методы. Материалом для исследования служил 41 образец от пациентов с гистологическим заключением «неспецифический язвенный колит», из которых выделяли ДНК и проводили амплификацию родоспецифичных фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 Touch "Real time" (Bio-Rad, США). Для этого использовались подобранные нами родоспецифические праймеры на консервативные последовательности генов 16S рРНК *Campylobacterspp.*

Результаты и обсуждение. Подобранные праймеры перед использованием были проверены на гомологию к искомым ампликонам. Анализ праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST. Показано, что форвард и реверс праймеры обладали 100% сходимостью по отношению к различным видам бактерий рода *Campylobacter*. Для анализа специфичности участок 16S рРНК *Campylobacterspp.* был выровнен на гомологичные участки 16S рРНК бактерий родов *Escherichia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. В результате выравнивания было установлено, что праймеры обладают должной специфичностью и не дают ложноположительные результаты.

Для проверки подобранных родоспецифичных праймеров провели амплификацию с выделенной ДНК чистых культур различных видов микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Pseudomonas aeruginosa*. В результате в каждом

образце были получены отрицательные результаты, что свидетельствует о том, что подобранные праймеры не комплементарны участкам ДНК данных бактерий и обладают специфичностью. Полученные результаты амплификации позволяют утверждать, что использование подобранных праймеров исключает ошибку диагностики при дифференциации рода *Campylobacter* от бактерий родов *Escherichia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. Далее были исследованы образцы выделенной ДНК от больных с НЯК.

В результате проведения ПЦР в режиме реального времени с ДНК исследованных проб во всех случаях были получены положительные результаты, свидетельствующие о наличии в них искомым бактерий рода *Campylobacter* (рис.1).

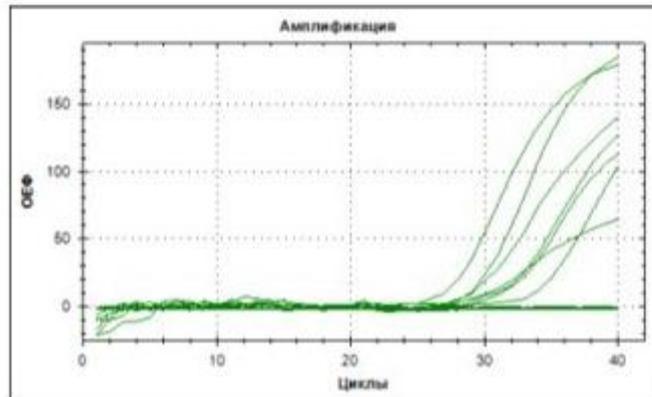


Рис. 1. Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК 2 способом

Показанные на рисунке различия в графиках могли быть обусловлены различными концентрациями искомой ДНК.

В целом же полученные результаты могут свидетельствовать о комплементарности подобранных нами олигонуклеотидных праймеров и возможности их дальнейшей оптимизации для разработки соответствующих диагностических систем, применимых для получения новых данных об этиологии неспецифического язвенного колита и других воспалительных заболеваний кишечника.

образце были получены отрицательные результаты, что свидетельствует о том, что подобранные праймеры не комплементарны участкам ДНК данных бактерий и обладают специфичностью. Полученные результаты амплификации позволяют утверждать, что использование подобранных праймеров исключает ошибку диагностики при дифференциации рода *Campylobacter* от бактерий родов *Escherichia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. Далее были исследованы образцы выделенной ДНК от больных с НЯК.

В результате проведения ПЦР в режиме реального времени с ДНК исследованных проб во всех случаях были получены положительные результаты, свидетельствующие о наличии в них искомым бактерий рода *Campylobacter* (рис.1).

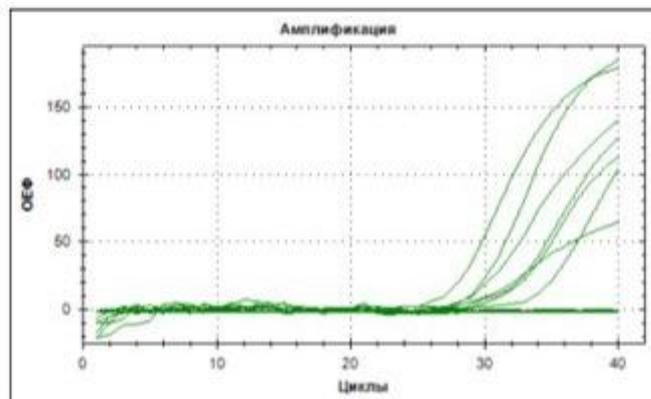


Рис. 1. Результаты амплификации ПЦР в режиме реального времени при выделении ДНК 2 способом

Показанные на рисунке различия в графиках могли быть обусловлены различными концентрациями искомой ДНК.

В целом же полученные результаты могут свидетельствовать о комплементарности подобранных нами олигонуклеотидных праймеров и возможности их дальнейшей оптимизации для разработки соответствующих диагностических систем, применимых для получения новых данных об этиологии неспецифического язвенного колита и других воспалительных заболеваний кишечника.

Литература

1. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.- 2014.- Т.5.- С.42-53.
2. Azimi T., Nasiri M.J., Chirani A.S., Pouriran R., Dabiri H. The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review.// APMIS.- 2018.- V.126, N4.- P.275-283.
3. Chen W.X., Ren L.H., Shi R.H. Enteric microbiota leads to new therapeutic strategies for ulcerative colitis.// World J Gastroenterol.- 2014.- V.20, N42.- P. 15657-15663
4. Hold G.L., Smith M., Grange C., Watt E.R., El-Omar E.M., Mukhopadhye I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years?// World J Gastroenterol.- 2014.- V.20, N5.- P.1192-1210
5. Wu X.W., Ji H.Z., Yang M.F., Wu L., Wang F.Y. *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease in Asians: A meta-analysis.// World J Gastroenterol.- 2015.- V.21, N15.- P. 4750-4756
6. Zhang L. Oral *Campylobacter* species: initiators of a subgroup of inflammatory bowel disease?// World J Gastroenterol.- 2015.- V.21, N31.- P.9239-9244

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Юмагужина Гульнара Камилевна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГЕНА КОЛИБАКТИНА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА».

Представленная работа посвящена проблеме разработки новых подходов к детекции в клиническом материале и оценке биомедицинского значения гена колибактина *E. coli*, который входит в состав острова генотоксичности (*pks*). Колибактин в настоящее время пристально изучается во всем мире, поскольку вызывает нарушения структуры двухцепочечной ДНК, в частности, энтероцитов и может рассматриваться в качестве одной из причин онкопатологии кишечника, связываемой с нарушениями микробиоты человека.

За время обучения в БГМУ Юмагужина Г.К. освоила учебную программу в достаточном объеме. Все годы училась на «хорошо».

В процессе выполнения ВКР Юмагужина Г.К. приобрела необходимые навыки работы с микроорганизмами. Освоила приемы их идентификации и исследования методом ПЦР. Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы в виде устных сообщений на конференциях, включая международные (БГМУ-2018 и др.).

В ходе выполнения ВКР Юмагужина Г.К. продемонстрировала компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Юмагужиной Г.К. 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 Ф.Р. на выпускную квалификационную работу Юмагужиной Гульнары Камилевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГЕНА КОЛИБАКТИНА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА».

Во всем мире одной из наиболее распространенных и острых проблем являются воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относят болезнь Крона и язвенный колит. Эти заболевания характеризуются хроническим и рецидивирующим воспалением кишечника, этиология которого остается неясной. Вместе с тем относительно недавно было показано, что одной из причин указанного могут являться варианты *Escherichia coli*, продуцирующие один из бактериальных токсинов – колибактин. Последний может вызывать разрывы двухцепочечных молекул ДНК, что инициирует онкогенез (Nougayrede J.P., 2006).

В этой связи молекулярно-генетическая детекция и оценка частоты встречаемости фрагментов гена колибактина *Escherichia coli* при острых кишечных инфекциях и в биоптатах является актуальным.

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 Юмагужиной Гульнары Камилевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГЕНА КОЛИБАКТИНА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА», выполненная под руководством зав. кафедрой ФПМ, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершенной 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	Юмагужина Г.К.
Факультет, кафедра, номер группы	
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГЕНА КОЛИБАКТИНА ESCHERICHIA COLI ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА
Название файла	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ГЕНА КОЛИБАКТИНА ESCHERICHIA COLI ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА.docx
Процент заимствования	18,53%
Процент цитирования	0,62%
Процент оригинальности	80,85%
Дата проверки	13:49:23 22 июня 2018г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Модуль поиска "БГМУ"; Модуль выделения библиографических записей; Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна <small>ФИО проверяющего</small>
Дата подписи	22.06.2018г. 

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.