

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *HELICOBACTER* В ОРГАНИЗМЕ
СТРЕССИРОВАННЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С
ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПЦР**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

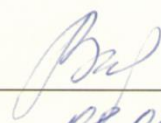
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Кутисовой Алёны Рафиковны

Научный руководитель

к.б.н., доцент кафедры биохимии и
биофизики



В. А. Великов

08.06.2018

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор



С. А. Коннова

08.06.2018

Саратов, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Человеческий организм – это экологическая ниша для различных микроорганизмов. Они взаимодействуют с организмом человека за счет обмена молекулами. Бактерии заселяют определенные участки ткани органов и способны специфически влиять на их функции. Одной из таких бактерий является *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori– одна из значимых причин развития заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки, таких как язвенная болезнь, гастрит и т.д.

Установлено, что хронические гастриты и язвы желудка играют большую роль в возникновении рака. Злокачественные новообразования занимают второе место среди причин смерти в экономически развитых странах и третье место – в развивающихся. Во всём мире от рака погибает больше людей, чем суммарно от СПИДа, туберкулёза и малярии. Рак желудка занимает одно из ведущих мест в общей структуре онкологической заболеваемости, особенно в развивающихся странах, и второе место среди опухолей желудочно-кишечного тракта и составляет примерно 10 % в структуре смертности от всей онкопатологии. Ежегодно в мире регистрируется порядка миллиона новых случаев рака желудка и 628 тысяч летальных исходов.

Рак желудка является третьей ведущей причиной онкологической смертности во всем мире. Частично это происходит из-за бессимптомного характера течения заболевания, обычно это и приводит к выявлению опухоли на поздней стадии, при которой варианты лечения весьма ограничены.

Исходя из вышесказанного, цель работы состояла в определении наличия бактерий рода *Helicobacter* в желудочно-кишечном тракте лабораторных животных с индуцированным канцерогенезом с помощью метода ПЦР.

Для реализации поставленной цели были сформулированы и решались следующие задачи.

1. Индуцировать предраковые состояния у лабораторных животных в хроническом эксперименте стрессовыми факторами и химическими агентами;
2. Определить наличие бактерий рода *Helicobacter* в ЖКТ исследуемых лабораторных животных;
3. Выявить корреляцию между наличием бактерии рода *Helicobacter* с индуцированным канцерогенезом.

Материалы и методы. Работа проведена в Лаборатории молекулярной биологии биологического факультета СГУ в рамках Гранта "Рак желудка и инновационные решения: модель трансформации язвенных поражений в онкологию, механизмы воздействия провоцирующих биоэкологических факторов, оптическая диагностика, сигнальные системы и методы предотвращения развития метастазов, профилактика в группах риска" (рук. д.б.н. профессор Семячкина-Глушкова Оксана Валерьевна).

Объект исследования. В ходе работы были использованы беспородные лабораторные белые крысы и мыши линии BALB/C. Были исследованы 2 группы крыс:

1. Контроль (стандартный рацион, отсутствие стрессовых воздействий);
2. Опыт (в стандартный рацион был введён *m*-толуидин в пащете из расчёта 5 мкг/крыс/сутки и нитрит натрия в питьевой воде в концентрации 0,2%, в качестве стрессового фактора было использовано перенаселение).

Были использованы 68 животных, возрастом 4 месяца и массой 200-250 г.

Также были исследованы 3 группы мышей:

1. Мыши, опытная группа 1, 6 животных (1-6) (стандартный рацион, в качестве стрессового фактора был использован свет (800 люкс, круглосуточное освещение));
2. Мыши, опытная группа 2, 6 животных (7-12) (в стандартный рацион был введён *m*-толуидин в пащете из расчёта 5 мкг/мышь/сутки и нитрит натрия в питьевой воде в концентрации 0,2%, в качестве стрессового фактора был использован свет (800 люкс, круглосуточное освещение));

3. Мыши, контрольная группа 4 животных (13-16) (стандартный рацион, без стрессовых воздействий).

При работе с животными соблюдались правила в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals» (Geneva, 1990).

Выявление бактерий рода *Helicobacter* выполняли методом ПЦР с использованием видоспецифичных и родоспецифичных праймеров.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения и списка используемых источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и обсуждение. Литературный обзор составлен на основе анализа 48 источника, в нем рассмотрены следующие вопросы: морфология *Helicobacter pylori*, роль *Helicobacter pylori* в экологии человека, факторы патогенности, история открытия данного микроорганизма. А так же были рассмотрены две группы методов диагностики *Helicobacter pylori* (инвазивные и неинвазивные). И подробно описан метод полимеразной цепной реакции: постановка ПЦР-реакции, безопасность и меры предосторожности, расчет температуры отжига праймера, параметры ПЦР, используемые ДНК-полимеразы, правила подбора праймеров. Раздел материалы и методы состоит из четырех подразделов: приготовление среды для культивирования *Helicobacter*, культивирование микрофлоры из экскрементов крыс и содержимого желудка мышей, выделение ДНК, ПЦР. Результаты исследований представлены в главе Результаты и обсуждение.

ОСНОВНОЕ СОДЕЖАНИЕ РАБОТЫ

В модельном эксперименте мы исследовали возможную связь между присутствием бактерий рода *Helicobacter* с процессом опухолеобразования в желудочно-кишечном тракте лабораторных животных с индуцированным канцерогенезом.

Нами были предложены две модели индуцирования предраковых состояний: химический канцерогенез на фоне избыточной освещённости и на фоне перенаселённости. Избыточная освещённость создавалась путём постоянного действия света интенсивностью 800 люкс. Для перенаселения были сформированы группы животных с плотностью населения 50 животных на 1 м². С целью моделирования процессов химического канцерогенеза в ходе хронического эксперимента подопытные животные получали 0,2% раствор нитрита в питьевой воде и м-толуидин в пище. Доза м-толуидина составила 25 мг/кг живого веса.

В ходе эксперимента животные в опытных группах становились менее активными в отличие от контрольных групп, что может свидетельствовать о развитии патологических процессов под действием стрессовых факторов и химических соединений.

Культивирование бактерий осуществляли на стрептококковом кровяном агаре. Инкубировали в термостате 7 суток при 37°C.

Выросшие на чашках Петри бактериальные культуры смывали с чашки с буфером TE и ресуспендировали клетки в 1 мл этого буфера.

Выделение ДНК происходило с помощью готового набора реагентов, произведенного фирмой «Синтол» (Россия).

Праймеры синтезированы фирмой «Синтол». ПЦР проводили при следующем режиме: предварительная денатурация матрицы при 95°C – 5 мин, затем следующие 30 циклов – денатурации ДНК при 95°C – 30 с, отжиг праймеров при 53°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин. Окончательная достройка цепей при 72°C – 5 мин.

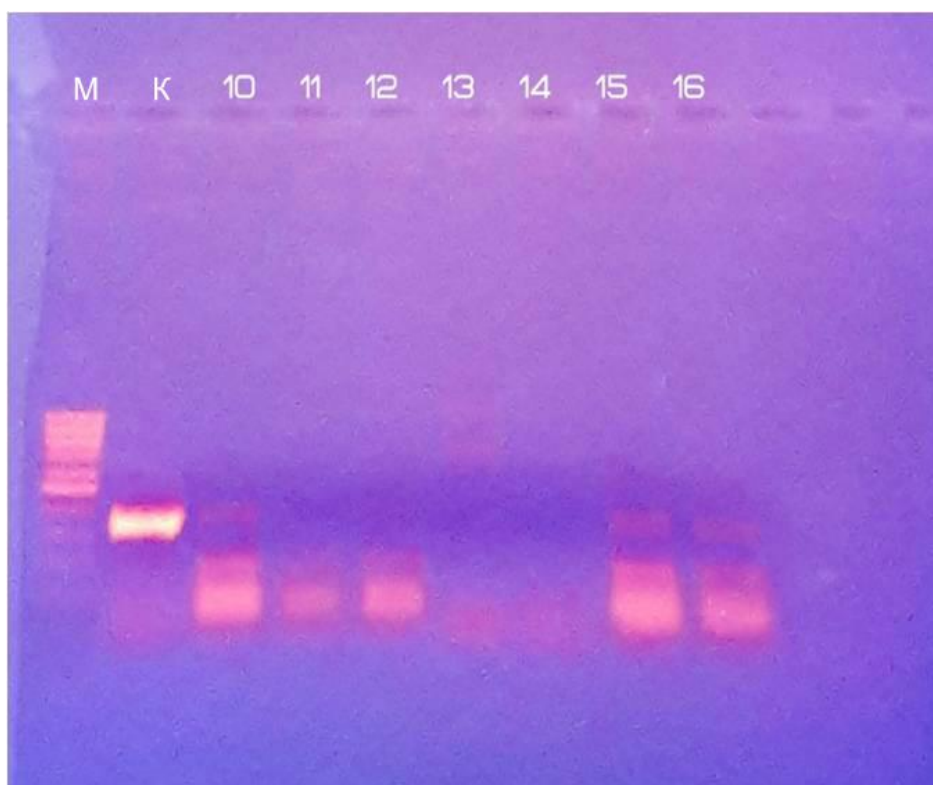
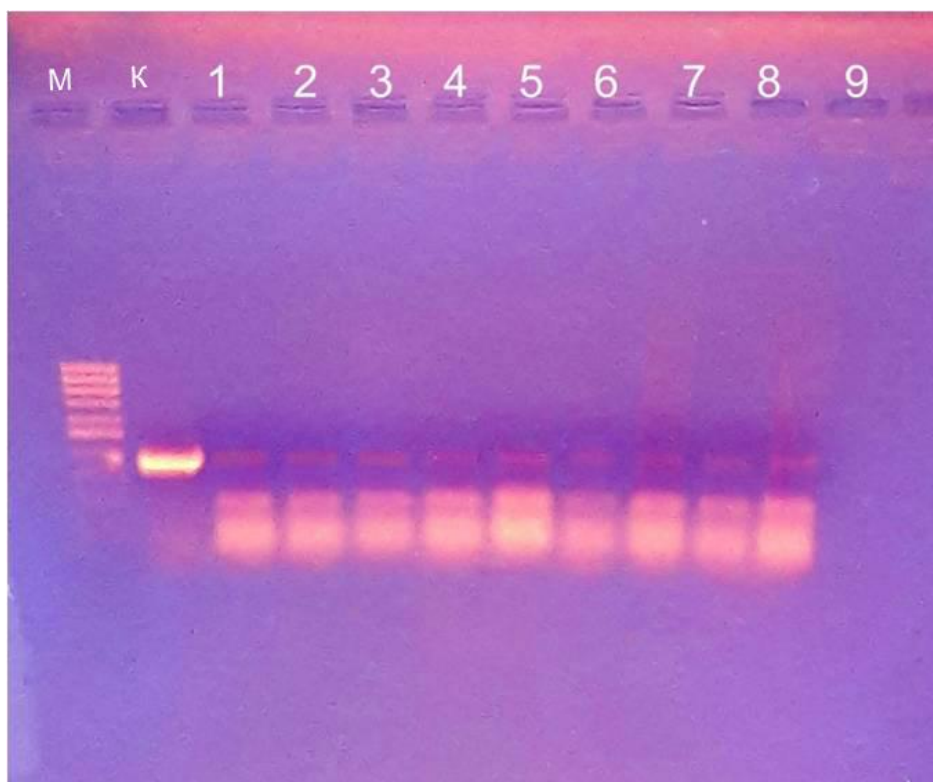
В ходе работы были использованы видоспецифичные праймеры на 23S РНК данной бактерии следующего состава: (HPY-S) 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3', (HPY-A) 5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3', которые не дали положительного результата. Можно предположить, что отрицательный результат на видоспецифичные праймеры обусловлен присутствием других возможных видов хеликобактерий в ЖКТ мышей.

Также были использованы родоспецифичные праймеры следующего состава на 16S рРНК данной бактерии 16-1F, 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3' и 16-1R, 5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3'.

В эксперименте по культивированию микрофлоры из содержимого желудка мышей был выявлен род *Helicobacter* в образцах 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,16 экспериментальных групп, что, по-видимому, подтверждает инфицирование как действующий фактор в данном эксперименте. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Было установлено, что бактерии присутствовали как у интактных, так и у опытных крыс и мышей. Это свидетельствует о том, что химические агенты, используемые для индукции развития предраковых заболеваний, не приводят к гибели хеликобактерий в ЖКТ исследуемых животных. Хеликобактерии при понижении сопротивляемости организма способны вызывать развитие предраковых состояний, таких как гастрит и язва, следовательно, их присутствие в желудках животных может усугублять процессы, протекающие под влиянием химических агентов и стресса.

В результате ПЦР в тканях желудка мышей выявлены бактерии рода *Helicobacter* (таблица 1).



М – Маркер молекулярного веса; К–Положительный контроль; 1-6–мыши, опытная группа 1, 7-12–мыши, опытная группа 2, 13-16–контрольная группа мышей.

Рисунок 2 – Электрофореграммы продуктов амплификации на родоспецифичные праймеры.

Таблица 1 – Результат ПЦР-анализа на родоспецифичные праймеры (культивирование из содержимого желудка мышей)

	Общее количество проанализированных образцов	Количество положительных результатов	Процент положительных результатов
Контроль	4 образцов	2 образцов	50%
Опытная группа 1	6 образцов	6 образцов	100%
Опытная группа 2	6 образцов	4 образца	66,7%

Общий процент позитивных образцов в опытных группах составил 83,3. Полученные результаты хорошо коррелируют с результатами вскрытия. У опытных животных, находящихся под влиянием стресса и воздействием химическими агентами, наблюдались язвы в желудке, новообразования в кишечнике и печени.

Также было исследовано 68 образцов, культивирование которых проводилось из экскрементов крыс. Процент положительных результатов в опыте составил 29,8 (таблица 2). Этот результат почти в 2 раза меньше, чем для экспериментов с желудочным содержимым мышей.

Таблица 2 – Результат ПЦР-анализа на родоспецифичные праймеры (культивирование из экскрементов крыс)

	Общее количество проанализированных образцов	Количество положительных результатов	Процент положительных результатов
Контроль	11 образцов	0 образцов	0%
Опыт	57 образцов	17 образцов	29,8%

Высокий процент ПЦР-позитивных проб при культивировании из содержимого желудка (83,3%) и низкий процент ПЦР-позитивных проб при

культивировании микрофлоры из фекалий (29,8%) может быть связан с тем, что бактерия очень чувствительна к воздействию желчных кислот и пониженному содержанию кислорода, поэтому при пассаже химуса через двенадцатиперстную и толстую кишку количество бактерий значительно снижается. Исходя из этого, можно предположить, что исследование микрофлоры экскрементов животных менее эффективно, чем исследование желудочного содержимого. Несмотря на то, что получение результатов о бактериях желудка относится скорее к инвазивным методам исследования, это гораздо более информативный способ диагностики хеликобактериоза. В то время как присутствие бактерий рода *Helicobacter* в экскрементах может наблюдаться уже на поздних сроках течения болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение бактерий рода *Helicobacter* в желудочно-кишечном тракте стрессированных крыс и мышей с индуцированным канцерогенезом может свидетельствовать о возможной вовлеченности этой бактерии в процесс опухолеобразования.

Вероятно, хронический гастрит приводит к кишечной метаплазии (атрофическому гастриту), который далее претерпевает злокачественные изменения. На финальной стадии *Helicobacter pylori* может уже и не обнаруживаться при биопсии, однако иммунологические исследования могут показать, что инфекция присутствовала в прошлом.

ПЦР-метод для выявления гена *Helicobacter pylori* в биологическом материале применяется довольно давно в качестве контрольного метода научных исследованиях, однако оптимизация методики привела к ее существенному удешевлению и возможности использования в клинической практике. Ряд авторов считают ПЦР наиболее чувствительным методом оценки эрадикации в ранние сроки после лечения.

Для диагностики хеликобактериоза необходимо использовать одновременно не менее 2 тестов. Это обусловлено тем, что практически ни

один из применяемых методов не обладает 100% чувствительностью. В научных целях проводятся сравнение 3-4 методов, основанных на различных эффектах

Кроме того, активные спиралевидные формы бактерий претерпевают морфологические изменения, обеспечивающие большую устойчивость в неблагоприятных условиях. Результатом этого становится низкая концентрация микроорганизмов и преобладание кокковых форм в кале, что следует учитывать при выборе лабораторного метода исследования этого биоматериала. В отличие от бактериологического посева ПЦР позволяет выявлять как спиралевидные, так и кокковые (некультивируемые) формы *Helicobacter pylori*.

Серьезность заболеваний, вызываемых хеликобактериями, ставит на повестку дня необходимость поиска эффективных, рациональных, неинвазивных, экономичных методов выявления инфицирования *Helicobacter pylori*. Само по себе выявление *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке не всегда свидетельствует о наличии заболеваний желудка или двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с этим инфекционным агентом. Обсеменение слизистой оболочки может встречаться и у совершенно здоровых людей, генетически невосприимчивых к *Helicobacter pylori*, у которых бактерия не способна к адгезии на эпителии. Значение имеют случаи сочетания инфицирования *Helicobacter pylori* и характерных эндоскопических признаков хронического антрального гастрита, пангастрита, хронического активного дуоденита, язвенной болезни желудка и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки.

ВЫВОДЫ

- 1) Установлено, что у опытных животных под действием физического стресса и воздействием на них химическими агентами, наблюдались язвы в желудке, новообразования в кишечнике и печени.

- 2) С помощью ПЦР-анализа в тканях желудка крыс и мышей выявлены бактерии рода *Helicobacter*, не относящиеся к виду *Helicobacter pylori*.
- 3) Обнаружение достаточно высокого процента позитивных образцов в желудочно-кишечном тракте мышей (83,3%) с индуцированным канцерогенезом может свидетельствовать о возможной вовлеченности бактерии рода *Helicobacter* в процесс опухолеобразования.

Лутис