

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 ХЕЛИКОБАКТЕРИЙ В ЖЕЛУДКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ
ЖИВОТНЫХ В ДИНАМИКЕ ИНТОКСИКАЦИИ В ХОДЕ
ХИМИЧЕСКОГО ИНДУЦИРОВАНИЯ ПРЕДРАКОВЫХ ПАТОЛОГИЙ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Магистранта 2 курса 241 группы
направления подготовки 06.04.01 - Биология
биологического факультета
Кенжегулова Одиссея Альбертовича

Научный руководитель:

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор


С.А. Коннова
(подпись, дата)
20.06.2018

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор


С.А. Коннова
(подпись, дата)
20.06.2018

Саратов, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В последние десятилетия рак желудка был и остается в числе явных лидеров среди онкологических заболеваний. К сожалению, он является одной из ведущих причин смертности во всем мире. На сегодняшний день рак желудка занимает четвертое место в мире среди злокачественных новообразований. Ежегодно в мире регистрируется до 800 тыс. новых случаев заболевания [1]. Длительность жизни больных раком желудка зависит, прежде всего, от того насколько рано будет установлен правильный диагноз и начато адекватное лечение. На сегодняшний день, проблема раннего выявления этого заболевания становится все более актуальной.

Как известно, хронический гастрит и язва желудка являются состояниями, предшествующими раку желудка. Ключевым моментом является тот факт, что инфекции *Helicobacter pylori* отводится главенствующая роль в патогенезе данных состояний. Это определяет потребность в понимании механизмов, лежащих в основе канцерогенеза желудка. Знание механизмов развития онкопатологии поможет в создании действенных методов лечения.

Цель работы: выявление хеликобактерий в желудке в динамике интоксикации в ходе химического индуцирования предраковых патологий ЖКТ белых беспородных крыс. Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Индуцировать предраковые состояния у белых беспородных крыс путем введения в рацион ароматического амина, нитрита натрия и пиперазина в воде.
2. Из содержимого желудка опытных и контрольных животных получить накопительные культуры на питательной среде, селективной для хеликобактерий.
3. Выделить из накопительной культуры тотальную ДНК и выявить в ней наличие ДНК хеликобактерий методом ПЦР.

Научная новизна магистерской работы: впервые предложена модель химического индуцирования предраковых патологий ЖКТ белых беспородных крыс путем сочетанного использования ароматического, циклического аминов и нитрата натрия.

Научная и практическая значимость: Предложенная в данной работе модель химического индуцирования предраковых патологий ЖКТ имеет перспективы использования в экспериментальной онкологии. Разработка эффективных экспериментальных моделей открывает возможности изучения патогенеза опухолевого роста, а также выработке улучшенных лечебных тактик.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Смыв содержимого желудка животных при условии использования технологии «накопительной культуры» на селективной среде, может быть использован для выявления их инфицирования представителями рода *Helicobacter*.
2. При хроническом воздействии ароматических аминов в сочетании с нитритом натрия и инфицированием желудка бактериями рода *Helicobacter* наблюдается развитие различных патологий у 70 % экспериментальных животных.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования были взяты 40 самок белых беспородных крыс, возрастом 3 месяца и весом 200-250 г. Экспериментальные животные были разделены методом случайного отбора на 6 групп. Животным опытной группы в рацион питания вводили паштет с амином из расчета: 25 мкг м-толуидина на 1 кг веса животного, а вместо питьевой воды использовали нитритно-пиперазиновую воду. В качестве контрольной группы были взяты 3 особи, содержащиеся на стандартном рационе с включением в рацион рыбного паштета. Эксперимент проводили в течение 9 месяцев, без дополнительного стрессирования.

Для достижения поставленной цели и решения задач получали накопительную культуру хеликобактерий из смывов с желудка белых беспородных крыс, выделяли тотальную ДНК из полученных культур с последующей постановкой ПЦР-анализа и детекцией результатов с помощью агарозного гель-электрофореза ДНК. При постановке ПЦР использовали видоспецифичные праймеры для амплификации фрагмента гена *23S pPHK* и родоспецифичные праймеры для амплификации фрагмента гена *16S pPHK*.

Структура магистерской работы. работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен из 118 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: роль *H. pylori* в развитии патологий ЖКТ, история открытия *H. pylori*, факторы патогенности *H. pylori*, идентификация *H. pylori*, моделирование канцерогенеза у лабораторных животных, роль других хеликобактерий в развитии патологий ЖКТ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Несмотря на многочисленные успехи в изучении причин злокачественных новообразований ЖКТ, их частота и смертность от них продолжает увеличиваться. Для решения данной проблемы требуется разработка и использование оптимальных способов индукции опухолей ЖКТ у лабораторных животных. Классическим объектом экспериментальной онкологии являются мыши и крысы.

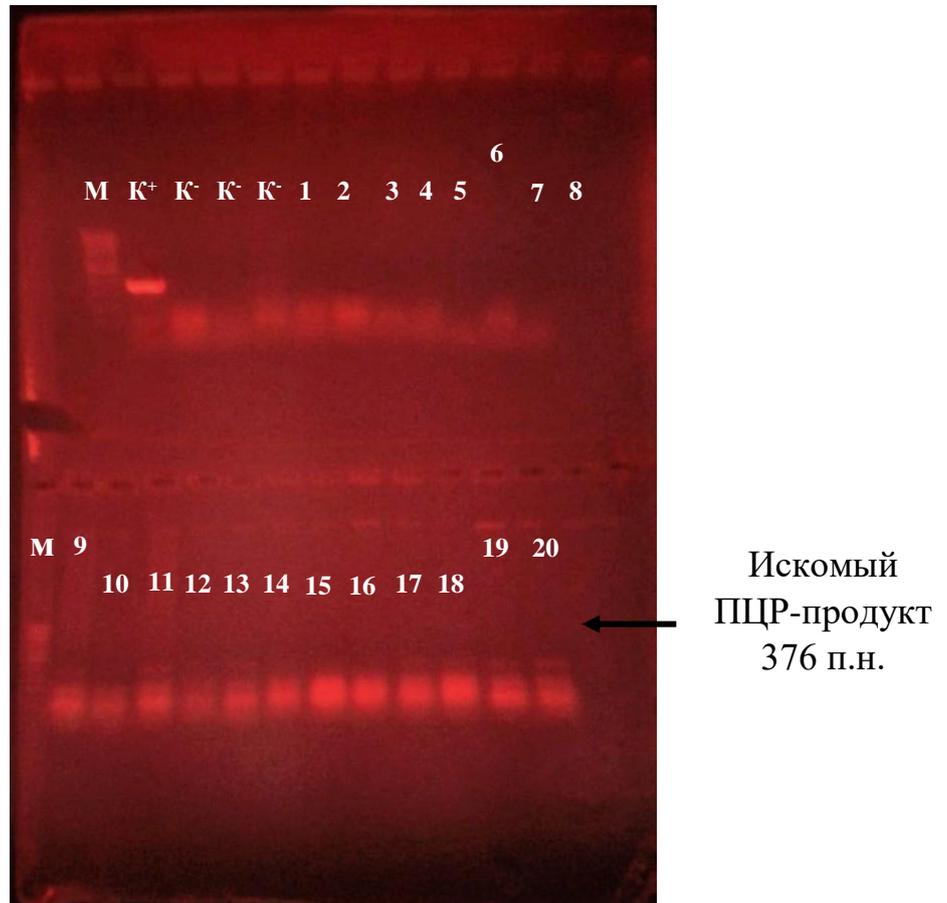
В данной работе для получения предраковых состояний ЖКТ на крысах были использованы м-толуидин в пище, нитриты и пиперазин в воде. Данные вещества в процессе совместного действия в ЖКТ образуют сильные канцерогены. Исследования проводились на 40 опытных и 3-х интактных особях женского пола белых беспородных крыс. Опытные животные в течение 9 месяцев подвергались воздействию м-толуидина в сочетании с нитритом натрия и пиперазином. На момент окончания эксперимента количество опытных животных сократилось на 17,5 %, что составило 7 особей. Снижение количества лабораторных животных обусловлено тем, что продолжительное воздействие канцерогенов и токсикантов привело к снижению иммунитета и в некоторых клетках наблюдали развитие бактериальных инфекций у животных. Такие особи выбраковывались.

В наших экспериментах по получению накопительной культуры хеликобактерий использовались смывы с желудка белых беспородных крыс, из которых проводили культивирование и выделение хеликобактерий. На питательной среде на 5-7 сут. наблюдалось формирование мелких, круглых, гладких, прозрачных, колоний диаметром около 1 мм, характерных для *H. pylori* [2]. Развитие посторонней флоры подавлялось присутствием в селективной среде антибиотиков. Из полученных колоний проводили выделение тотальной ДНК с последующей постановкой ПЦР-анализа.

В данной работе, при постановке ПЦР-анализа были использованы видоспецифичные праймеры для амплификации фрагмента гена *23S rRNA* длиной 267 п.н. бактерии *H. pylori*: (HPY-S) 5'-

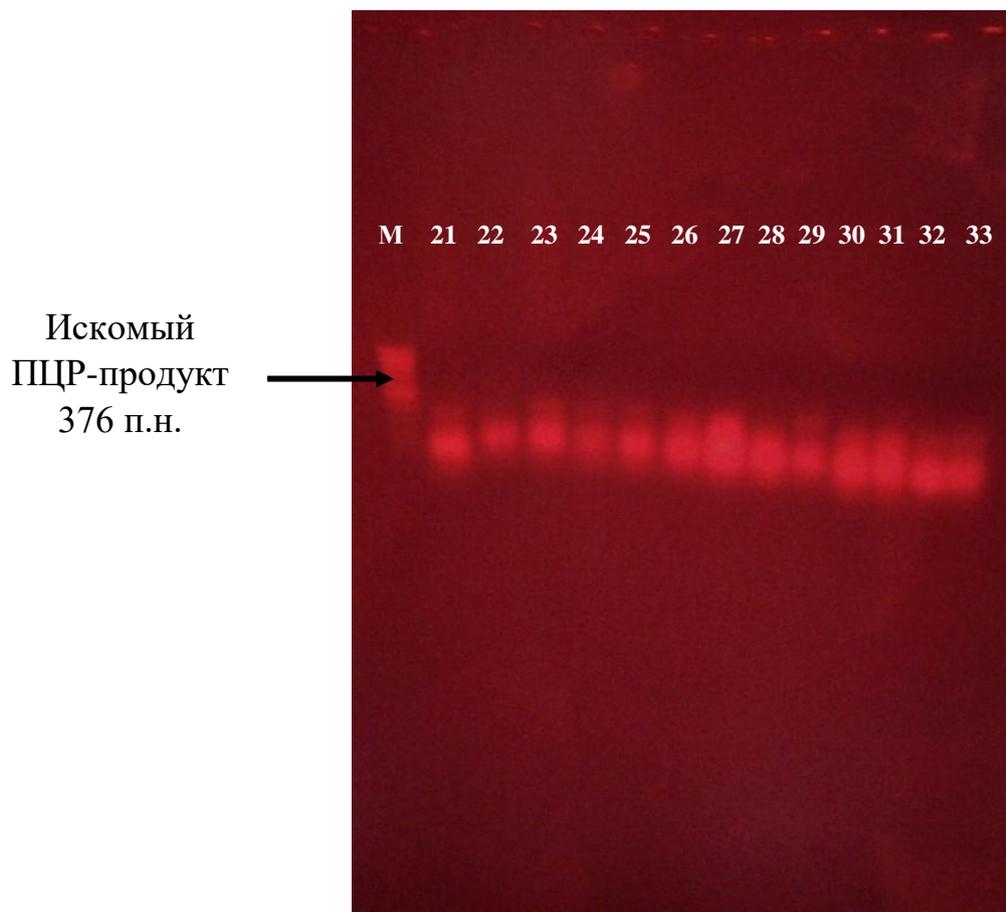
AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3', (HPY-A) 5'-
CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3'. В проведённых нами экспериментах с использованием видоспецифичных праймеров ДНК *H. pylori* не была выявлена ни в опытных, ни в контрольных образцах на всех этапах исследования. Полученный в данных экспериментах отрицательный результат указывает на отсутствие в желудке крыс *H. pylori*, однако не исключает присутствия в исследуемых образцах других возможных видов хеликобактерий, на наличие которых указывают литературные данные [3]. Известно, что в нормофлоре кишечника и желудке у крыс присутствуют бактерии видов *H. bilis*, *H. rappini*, *H. muridarum*, *H. rodentium*, *H. trocontum*, *H. cinaedi*, *H. typhlonius*, *H. gonmani*, *H. felis*. В желчном пузыре, желудке и кишечнике персистирует вид *H. hepaticus*. Второй возможной причиной полученного отрицательного результата исследований по выявлению ДНК *H. pylori* у исследуемых крыс может быть повышенная чувствительность этого вида к формирующимся в желудке условиям в хроническом эксперименте, что приводит к эрадикации *H. pylori* и у контрольной группы крыс. В связи с чем были выполнены исследования тех же образцов ДНК смывов желудка с родоспецифичными праймерами.

Был выполнен ПЦР-анализ с родоспецифичными праймерами для амплификации фрагмента гена *16S pPHK* длиной 376 п.н. бактерий рода *Helicobacter*: 16-1F, 5-СТАТGACGGGTATCCGGC-3' и 16-1R, 5-АТТССАССТАССТСТСССА-3. В ходе проведенного эксперимента с родоспецифичными праймерами удалось выявить ДНК бактерий рода *Helicobacter* в образцах смывов желудка у 16 из 33 особей опытных групп животных, как показано на рисунках 1 и 2. Ни у одной особи из контрольной группы ДНК хеликобактерий выявлена не была.



М – маркер молекулярного веса; K^+ – положительный контроль; K^- – отрицательный контроль; №1-20 – образцы ДНК смывов желудка отдельных особей (в треках №9-13, 17-20 – присутствует целевой продукт).

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов, отражающая результат выявления бактерий рода *Helicobacter* в образцах смывов желудка. Стрелкой отмечен целевой продукт.



М – маркер молекулярного веса; № 21-33 – образцы ДНК смывов желудка отдельных особей (в треках № 21, 23-27, 29 – присутствует целевой продукт).

Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов, отражающая результат выявления бактерий рода *Helicobacter* в образцах смывов желудка. Стрелкой отмечен целевой продукт.

На следующем этапе исследования мы сравнивали данные ПЦР-анализа по выявлению бактерий рода *Helicobacter* с видами патологий, обнаруженных при вскрытии самок белых беспородных крыс. Ни у одной, не дожившей до конца эксперимента особи при вскрытии не было выявлено патологий ЖКТ. Согласно выше представленным данным, в процентном соотношении у 48,4 % особей выявлено наличие ДНК бактерий рода *Helicobacter* в смывах желудка. По результатам вскрытия среди инфицированных особей у 68,7 % выявлена увеличенная селезенка, у 43,7 % особей зафиксирована атрофия стенок желудка, у 25 % наблюдалась низкая наполненность кровью внутренних органов, а у 18,7 % увеличена слепая кишка. Были зафиксированы единичные случаи новообразований легкого, печени, тонкого кишечника. Причиной высокого процента особей с увеличенной селезенкой является крайняя уязвимость органа к токсическому воздействию. Часто в результате действия канцерогенов и токсинов наблюдаются изменения селезенки в виде ее увеличения, изменения структуры [4]. По результатам вскрытия у 25 % особей выявлена низкая наполненность кровью внутренних органов, особенно данная патология выражена у печени. Известно, что печень является центром обмена веществ в организме, что обуславливает ее функциональное значение как основного органа, обеспечивающего поддержание гомеостаза. В печени происходит обезвреживание токсических веществ и подготовка их к выводу из организма [5]. Использование в данной работе ароматического амина, нитрита натрия и пиперазина является прямым фактором, способствующим развитию наблюдаемых патологий печени. Среди не зараженных особей явных патологий ЖКТ не выявлено, за исключением единичных случаев увеличения селезенки, слепой кишки и малокровия. На основе полученных данных можно сделать вывод, что наличие инфицирования в условиях химического канцерогенеза является важным фактором развития предраковых состояний.

В данной работе представлена модель химического индуцирования предраковых патологий ЖКТ белых беспородных крыс. Говоря об эффективности представленной модели, стоит отметить, что хотя рак желудка является одной из самых распространенных опухолей человека, у грызунов эта форма опухоли спонтанно встречается чрезвычайно редко. До настоящего времени еще нет удовлетворительной методики, которая позволяла бы закономерно получать в большом проценте опухоли желудка у экспериментальных животных. Зачастую, предраковые состояния и злокачественные новообразования печени, кишечника, селезенки индуцировать легче.

В данной работе мы использовали способ моделирования предраковых патологий ЖКТ путем добавления к пище и питьевой воде ароматических аминов и нитрита натрия. Отсутствие явных злокачественных опухолей у лабораторных животных вероятно, связано с отсутствием прямого негативного воздействия на слизистые оболочки желудка и других органов. Известно, что в результате введения канцерогенов крысам в рацион часто возникают опухоли не желудка, а различных других органов (молочной железы, легких, слухового хода, лейкозы и т. д.) [6]. Так, согласно литературным данным, чтобы достичь непосредственного контакта химических веществ с клетками слизистой оболочки желудка, вводят в желудок или пищевод с помощью зонда или оперативным путем непосредственно в стенку желудка в виде растворов, кристаллов, пилюль или пропитанных веществом нитей [7].

Важную роль в экспериментах по получению опухолей ЖКТ с использованием ароматических соединений играет диета животных. Особенно выражено влияние на канцерогенез рибофлавина. Известно, что при увеличении содержания рибофлавина в диете крыс, получающих 4-диметиламиноазобензол, процент животных, у которых возникают опухоли печени и желудка, резко снижается, а латентный период образования опухолей удлиняется [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе с помощью ПЦР анализа не удалось выявить наличие инфекции *H. pylori* ни в опытных, ни в контрольных группах лабораторных животных. Полученный отрицательный результат с видоспецифичными праймерами оставляет открытым вопрос выявления ДНК *H. pylori* в желудке белых беспородных крыс и поиск причин, влияющих на отсутствие положительных результатов детекции. Проведенный родоспецифичный ПЦР анализ выявил наличие ДНК бактерий рода *Helicobacter* в смывах желудка у 16 из 33 опытных животных, что составило 48,4 %. В ходе данного эксперимента была представлена модель химического канцерогенеза ЖКТ белых беспородных крыс. Было показано негативное влияние на организм лабораторных животных сочетанного действия нитрита натрия, ароматического амина, а также циклического амина - пиперазина, обладающего свойствами диаминов, что подтверждается выявлением у 68,7 % животных патологий ЖКТ.

ВЫВОДЫ

1. Получены накопительные культуры на селективной среде для выращивания хеликобактерий и выделена тотальная ДНК. Методом ПЦР с родоспецифичными праймерами проведено выявление ДНК хеликобактерий в содержимом желудка крыс.

2. Выявлено присутствие хеликобактерий в смывах желудка у 48,4 % опытных животных. В контрольной группе наличие ДНК хеликобактерий не выявлено. По результатам вскрытия среди инфицированных особей у 69 % выявлена увеличенная селезенка, у 44% особей зафиксирована атрофия стенок желудка, у 25 % наблюдалась низкая наполненность кровью внутренних органов, а у 19 % увеличена слепая кишка.

3. Показано, что содержание крыс в течение 9 месяцев на рационе с добавлением нитрита натрия, ароматического и циклического аминов приводит к формированию предраковых патологий у 68,7 % инфицированных животных, что подтверждено гистологическими исследованиями.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Global cancer statistics / D. M. Parkin [et al.] // CA: Cancer J. Clin. 2002. V. 55. P. 74-108.
2. Методы лабораторной диагностики инфекции, обусловленной *Helicobacter pylori* / А. Б. Жебрун [и др.]. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. 60 с.
3. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin / A. Menard [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. 2002. V. 46. P. 1156-1157.
4. Структурные преобразования лимфоидных органов при различных экспериментальных экзогенных воздействиях на организм / И. Н. Путалова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т. 17, № 32. С. 35-36.
5. Влияние окружающей среды на заболеваемость органов пищеварения / О. В. Сазонова [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2008. Т. 2. С. 151-154.
6. Шабада, Л. М. Успехи в изучении рака / Л. М. Шабада. М.: Издательство иностранной литературы, 1957. 364 с.
7. Холоденко, Р. В. Опухолевые модели в изучении онкологических заболеваний / Р. В. Холоденко, И. В. Холоденко, И. И. Доронин // Иммунология. 2013. № 5. С. 282-286.
8. Долгих, В. Т. Опухолевый рост / В. Т. Долгих. Ростов н/Д.: Феникс, 2007. 160 с.

