Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

ПЛАЗМИДНЫЙ ПРОФИЛЬ БАКТЕРИЙ НОРМАЛЬНОГО И МАЛИГНИЗИРОВАННОГО ЭПИТЕЛИЯ КИШЕЧНИКА

Работа завершена:

«2» июня 2015г. _____ (Н.Р. Ибрагимова)

Работа допущена к защите:

Научные руководители:

д.б.н., профессор, зав. каф. микробиологии

«5» июня 2015г. _____ (О.Н. Ильинская)

к.б.н., доцент каф. генетики

«5» июня 2015г. _____ (А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.н., профессор

«5» июня 2015г. _____ (В.М. Чернов)

Казань-2015

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3

ВВЕДЕНИЕ 4

1 **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 6

1.1 Нормальная микрофлора кишечника 6

1.2 Нарушения микрофлоры кишечника 10

1.2.1 Причины возникновения колоректального рака 11

1.3 Факторы вирулентности *Escherichia coli* 13

1.3.1 Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) 13

1.3.2 Цитолетальный растягивающий токсин (CDT) 14

1.3.3 Фактор ингибирования цикла (CIF) 15

1.3.4 Колибактин 16

1.4 Плазмиды *Escherichia coli* 17

1.4.1 Колициногенные плазмиды *Escherichia coli* 18

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 21

2 **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** 21

2.1 Бактериальные культуры 21

2.2 Определение грам-принадлежности изолятов 21

2.2.1 Определение выделенных бактерий из биоптатов 21

2.2.2 MALDI-TOF масс-спектрометрия 21

2.3 Выделение плазмидных ДНК из *Escherichia coli* 22

2.4 Электрофорез 22

3 **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** 24

3.1 Характеристика грам-принадлежности изолятов 24

3.2 Видовой состав культивируемой микрофлоры нормального и онкотрансформированного эпителия толстой кишки 25

3.3 Характеристика плазмид штаммов *Escherichia coli* нормального и озлокачествленного эпителия 27

ВЫВОДЫ 32

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 33

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является третьей наиболее часто диагностируемой злокачественной опухолью по всему миру, что составляет более полумиллиона смертей в год [Siegel *et al.*, 2007; Parkin *et al.*, 2005].

В последние годы в экономически развитых странах Европы и Северной Америки наблюдается значительный рост заболеваемости колоректальным раком. В мире выявляется не менее1.2 млн случаев КРР в год — 9.8%, что соответствует 3 месту после опухолей легкого (12.7%) и молочной железы (10.9%). Риск развития в равной степени касается мужчин и женщин, нарастая с каждым прожитым десятилетием. В России, как и в большинстве стран мира, отмечается неуклонный рост заболеваемости КРР. В среднем по России в 2011 году выявлены активно только 9.6% и 4.7% больных раком прямой и ободочной кишки, соответственно (в 1996 году — 5.8% и 1.4%) [Петрова с соавт., 2013].

Известно, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека населяют более одного триллиона микроорганизмов [Backhed *et al.*, 2005]. Значительный научный и практический интерес представляет участие микробиоты кишечника в этиологии злокачественных опухолей ЖКТ.

На сегодняшний день известны бактерии, ассоциированные с КРР: *Bacteroides fragilis, Escherichia coli, Streptococcus bovis, Helicobacter hepaticus, Helicobacter pylori, Citrobacter rodentium.*

E. coli является преобладающим факультативным микроорганизмом в ЖКТ человека. Не смотря на то, что кишечная палочка является синантропной бактерией микрофлоры человека и играет преимущественно положительную роль в процессе пищеварения, витаминном балансе, а также в создании местного, кишечного иммунитета, патогенные формы *E. coli* могут вызвать различные желудочно-кишечные заболевания, связанные с наличием специфических факторов колонизации, факторов вирулентности и патогенности. Различные исследования показывают четкую связь между

слизистой оболочкой, ассоциированной с *E. coli*, и раком прямой кишки [Arthur *et al.,* 2011; Swidsinski *et al.,* 1998; Martin *et al.,* 2004].

Таким образом, представляет значительный интерес сравнительная характеристика микрофлоры, колонизирующей нормальный и малигнизированный эпителий кишечника, особенно различий в плазмидном составе данных культур.

Целью настоящей работы является выделение и характеристика плазмид изолятов микрофлоры, колонизирующей нормальный и злокачественный эпителий толстой кишки. В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1) Охарактеризовать морфотипы изолятов культивируемой микрофлоры малигнизированного и нормального эпителия толстого кишечника.
2) Определить видовую принадлежность изолятов культивируемой микрофлоры малигнизированного и нормального эпителия толстого кишечника при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии.
3) Выделить плазмидную ДНК изолятов и провести сравнительный анализ плазмидного состава.