

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.04.01 (ОКСО 020400.62) – генетика

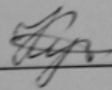
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА
ПРИ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

Работа завершена:

" 7 " июня 2018 г.



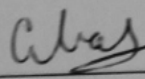
(Е.А. Куприянова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., н.с.

" 7 " июня 2018 г.

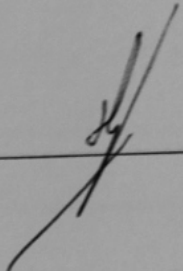


(С.Ю. Маланин)

Заведующий кафедрой

д.н., профессор

" 7 " июня 2018 г.



(В.М. Чернов)

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Бактерия <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.1.1 Мировая распространённость	8
1.1.2 Морфология <i>H. pylori</i>	9
1.1.3 Геном.....	10
1.1.4 Основы колонизации и патогенеза	12
1.2 Методы выявления <i>H. pylori</i>	13
1.3 Микробиота желудка.....	16
1.3.1 Микробиота желудка и <i>H. pylori</i>	18
1.3.2 Микробиота желудка и связь с заболеваниями.....	20
1.4 Секвенирование нового поколения и его применение в лабораторной диагностике	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	24
2.1 Образцы биологического материала	24
2.2 Олигонуклеотиды	24
2.3 Выделение РНК.....	24
2.4 Выделение ДНК	25
2.5 Обработка ДНКазой I.....	26
2.6 Обратная транскрипция	26
2.7 ПЦР	27
2.8 ДНК электрофорез.....	27

2.9 Подготовка библиотек ДНК	28
2.9.1 ПЦР с праймерами к 16S рРНК (V3-V4 вариабельный участок)	28
2.9.2 Очистка ПЦР продуктов с помощью AMPure XP beads.....	28
2.9.3 Индексирование	29
2.9.4 Секвенирование ДНК-библиотек.....	29
2.10 Анализ.....	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	31
3.1 Данные о пациентах и сбор материала.....	31
3.2 Выделение РНК и ДНК	32
3.3 Проверка <i>H. pylori</i> статуса	32
3.4 Метагеномный анализ биопсии СОЖ	33
3.4.1 Секвенирование гена 16S рРНК.....	33
3.4.2 Общий бактериальный состав СОЖ.....	37
3.4.3 Бактериальный состав по ДНК	39
3.4.4 Бактериальный состав по кДНК	43
3.5 Сравнение результатов метагеномного анализа ДНК и кДНК	46
ВЫВОДЫ.....	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	51

ВВЕДЕНИЕ

Бактерия *Helicobacter pylori* поражает слизистую оболочку желудка человека и может стать причиной заболевания верхних отделов желудочно-кишечного тракта, таких как хронический гастрит, дуоденит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, рак желудка [Dinis-Ribeiro *et al.*, 2012]. Открытие *H. pylori* в 1982 году перевернуло представление о том, что кислая желудочная среда является неподходящей для жизни бактерий, и поставило под сомнение устоявшиеся концепции в гастроэнтерологии. На данный момент считается, что бактерия *H. pylori* является одним из наиболее распространенных патогенов и встречается, по оценкам, у более 50% населения мира [Roberts *et al.*, 2016].

Однако дальнейшие исследования показали, что *H. pylori* является не единственным обитателем желудка, способными выжить в среде с низким значением pH, и другие микроорганизмы также могут колонизировать его отделы и выполнять определенную роль. Было показано, что микробный состав желудка человека отличается от микробиоты верхних дыхательных путей, рта или горла, а значит, желудок имеет собственную резидентную микрофлору [Ianiro *et al.*, 2015]. Современные знания указывают на возможную связь других бактерий, помимо *H. pylori*, с гастродуоденальными заболеваниями, такими как язвенная болезнь и рак желудка, однако данный вопрос нуждается в дальнейших исследованиях.

В последние десятилетия были разработаны различные диагностические методы, способные дать новое представление о составе желудочной микробиоты и её влиянии на весь желудочно-кишечный тракт. Культивирование на питательных средах, серологические реакции, температурный градиентный гель-электрофорез, анализ последовательности гена 16S рРНК, секвенирование нового поколения, а также метаболомные и протеомные исследования – вот некоторые из подходов, помогающих

максимально подробно описать структуру и функцию различных микробных сообществ. Однако на сегодняшний день существует лишь небольшое количество исследований, посвященных изучению непосредственно микрофлоры желудка. Также по сей день остаются малоизученными влияние *H. pylori* на других членов микробиоты желудка и возможное взаимодействие между ними. Данные исследований бактериального биоразнообразия слизистой оболочки желудка у *H.pylori*-положительных по сравнению с *H.pylori*-отрицательными образцами по-прежнему противоречивы.

В связи с этим, целью данной работы является характеристика микробного состава биоптатов слизистой оболочки желудка пациентов с наличием или отсутствием инфекции *H. pylori* с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

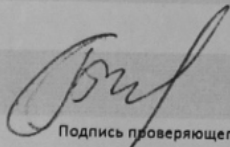
1. Выделить ДНК и РНК из образцов слизистой оболочки желудка (СОЖ) и определить их *H. pylori* статус;
2. Проанализировать метагеномное сообщество СОЖ у *H. pylori*-положительных и *H. pylori*-отрицательных пациентов на основе секвенирования 16S рДНК и рРНК;
3. Сравнить бактериальные составы СОЖ, выявленные при метагеномном анализе образцов ДНК и РНК;
4. Оценить уровни микробного биоразнообразия в *H. pylori*-положительных и *H. pylori*-отрицательных образцах с помощью индекса Шеннона.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Куприянова Елена Андреевна
Факультет, кафедра, номер группы	ИФМиБ, кафедра генетики, группа 1-640-1
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Метагеномный анализ слизистой оболочки желудка при инфекции <i>Helicobacter pylori</i>
Название файла	антиплагиат Куприянова Е.А..docx
Процент заимствования	3,23%
Процент цитирования	0,78%
Процент оригинальности	95,98%
Дата проверки	13:01:52 01 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РФБ; Сводная коллекция ЭБС
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	 Подпись проверяющего

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.