

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 - Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Характеристика адгезивных и апоптозіндуцирующих свойств изолятов  
энтеробактерий

Студент 4 курса  
группы 01-701

«31» 05 2021 г.

(Т.А. Васюткина)

Научный руководитель  
к.б.н., доцент

«31» 05 2021 г.

(П.В. Зеленихин)

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

«31» май 2021 г.

(О.Н. Ильинская)

Казань – 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	3
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	7
<b>1.1 Микрофлора желудочно-кишечного тракта</b>	7
<b>1.2 Вклад кишечной микробиоты в патогенез заболеваний кишечника</b>	11
1.2.1 Модификация состава микробиоты кишечника при болезни Крона	11
1.2.2 Модификация состава микробиоты кишечника при язвенном колите	14
1.2.3 Модификация состава микробиоты кишечника при синдроме раздраженного кишечника	16
<b>1.3 Адгезия микроорганизмов на клетках эукариот</b>	18
1.3.1 Исследование адгезивных свойств микроорганизмов	18
<b>1.4 Действие проантоцианидинов на метаболизм микроорганизмов</b>	19
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	24
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	24
2.1 Культура клеток	24
2.2 Микроорганизмы	24
2.3 Характеристика адгезивных свойств бактерий с помощью микроскопии и метода серийных разведений	25
2.4 Статистическая обработка результатов	28
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	29
<b>3.1 Адгезивные свойства микроорганизмов</b>	29
3.1.1 Адгезивные свойства лактобацилл	29
3.1.2 Адгезивные свойства изолятов и штаммов <i>E. coli</i>	29
3.1.3 Характеристика способности проантоцианидинов А клюквы изменять адгезивные свойства <i>E. Coli</i>	32
<b>ВЫВОДЫ</b>	34
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	35

## ВВЕДЕНИЕ

В наше время сохраняет свою актуальность проблема воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), таких как болезнь Крона, хронический колостаз (ХК), язвенный колит (ЯК), первичный склерозирующий холангит (ПСХ), острый илеит и синдром раздражённого кишечника (СРК). Высказываются предположения, что в данных заболеваниях ведущую роль играет стрессовое или иммунное состояние организма, а также генетическая предрасположенность или инфекционный агент [Главнов с соавт., 2015]

Статистика распространенности заболеваний органов пищеварения каждый год увеличивается, обеспечивая экономические проблемы государствам ежегодными расходами на здравоохранение [Алексеевко, Дробот, 2015]. В Европе и Северной Америке за последние 40 лет число пациентов с ВЗК значительно увеличилось, при этом возрастает доля пациентов возрастной группы 20-30 лет. При этом отмечается, что постановка правильного диагноза часто осуществляется несвоевременно. При распространении 50-150 случаев на 100 000 человек ВЗК выявляется только у 2-7 человек на 100 000 жителей. [Князев с соавт., 2017]

Существует несколько теорий патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Основной гипотезой в настоящее время считается нарушение иммунорегуляции и активация иммунного ответа (ИО) по отношению к антигенам собственной кишечной микрофлоры у генетически предрасположенных лиц под воздействием определенных факторов внешней среды. Другая теория называется «гигиенической гипотезой», которая была сформулирована английским эпидемиологом Дэвидом Страчаном. Данная теория рассматривает влияние семьи в детском возрасте, посещение общественных мест, что предполагает большой контакт с различными микроорганизмами. Использование центрального водоснабжения, мыла, средств гигиенической защиты приводит к снижению

антигенного воздействия на организм в детстве, что может быть причиной чрезмерной иммунной реакции при контакте с микробами во взрослом возрасте, однако быстрая ликвидация бактерий с помощью антибиотиков и современных средств гигиены с антибактериальным действием не даёт возможности сформироваться собственному иммунитету против инфекций. А в 2003 году Г. Рук предложил гипотезу «старых друзей», суть которой заключается в том, что не только бактериальные инфекции, но и глистные инвазии, перенесенные в детстве, играют важную роль в формировании иммунитета, то есть важны не различные антигены окружающей среды, а микроорганизмы и паразиты («старые друзья»), обладающие низкой патогенностью [Бикбаева с соавт., 2019].

И, наконец, гипотеза «истощения биомов» объясняет рост заболеваемости ВЗК с точки зрения потери видового разнообразия и изменения состава комменсального микробиома в организме человека. Изменение разнообразия микробиоты происходит в результате отказа от грудного вскармливания в младенчестве, использования антибактериальных препаратов, генетической предрасположенности. Но наибольшее влияние на кишечный микробиоценоз оказывают диетические предпочтения («вестернизация») и изменение основных подходов к питанию (широкое использование полуфабрикатов, сахарозаменителей, консервантов, модификаторов вкуса и пр.) [Бикбаева с соавт., 2019].

Известно, что при СРК и ХК происходит снижение бактериального разнообразия и повышение временной нестабильности кишечной микрофлоры. Дисбиотическая нестабильность в микробиоте при данных заболеваниях часто выражается в уменьшении содержания пробиотических родов, например, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, при параллельном увеличении числа потенциально патогенных представителей, например, семейства *Enterobacteriaceae* [Zhu et al., 2014; Salem et al., 2018]. Анализ микробиоты толстой кишки является необходимой частью обследования пациентов с СРК и ХК [Bellini et al., 2015].

Важную роль в процессе развития ВЗК играет способность микроорганизмов к адгезии на эпителиальных клетках кишечника. Сравнительный анализ адгезивных свойств микроорганизмов поможет понять их роль в развитии воспалительных реакций слизистой оболочки кишечника.

Целью настоящего исследования стала характеристика адгезивных свойств изолятов *Escherichia coli* и исследование влияния проантоцианидина А клюквы (ПАЦ) на адгезивную способность микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) Отработать модельную систему для оценки адгезии микроорганизмов к эпителию кишечника на основе клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2;

2) В модельной системе эпителия кишечника – монослоя клеток Сасо-2 провести сравнительный анализ адгезивных свойств изолятов *Escherichia coli* при помощи микроскопии;

3) Подтвердить и валидировать данные микроскопического анализа с помощью метода серийных разведений;

4) Охарактеризовать способность проантоцианидина А клюквы изменять адгезивные свойства энтеробактерий.

## ВЫВОДЫ

1) С использованием лактобацилл отработана микроскопическая методика оценки адгезивных свойств микроорганизмов по отношению к модельной системе энтероцитов кишечника – монослою клеток Caco-2 ИАМ использованного в работе штамма составил 3.4 ед.

2) Охарактеризована адгезивность изолятов *E. coli* 1-39-12, 1-39-1, 3-192-2, а также штаммов *E. coli* Nissle, *E. coli* XL1 и *E. coli* ATCC, индекс адгезии изолятов 1-39-12, 1-39-1, 3-192-2 составил 7.96 ед., 7.38 ед. и 5.14 ед., а штаммов Nissle, XL1 и ATCC - 8.66 ед., 7.32 ед. и 6.6 ед., соответственно. Все исследованные культуры бактерий являлись высокоадгезивными.

3) Метод серийных разведений был менее точным, чем микроскопический анализ.

4) Проантоцианидины А клюквы при предварительном инкубировании микроорганизмов в их присутствии обладали концентрационнозависимой способностью, снижали адгезивные свойства штаммов *E. coli* Nissle, *E. coli* XL1 и *E. coli* ATCC. После обработки ПАЦ в концентрации 20 мг/мл индекс адгезии микроорганизмов уменьшался на 19.9%, 30.3% и 27.6% для штаммов *E. coli* Nissle, *E. coli* XL1 и *E. coli* ATCC, соответственно, относительно варианта без обработки.