

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

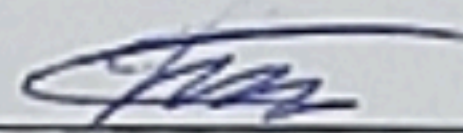
Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ВНУТРИИНДИВИДУАЛЬНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ КИШЕЧНОГО
МИКРОБИОМА ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

Студент 4 курса
группы 01-803

"__" _____ 2022 г.



(Китаева М.Е.)

Научный руководитель
к.б.н., старший научный
сотрудник, доцент


"__" _____ 2022 г.



(Шах Махмуд Р.З.)

Заведующий кафедрой
микробиологии
д.б.н., профессор

"__" _____ 2022 г.



(Ильинская О.Н.)

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Микробиота кишечника человека	7
1.2 Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	9
1.3 Патологии связанные с нарушением микробного состава	10
1.3.1 Ожирение	10
1.3.2 Воспалительные заболевания кишечника	11
1.3.3 Диабет	12
1.3.4 Рак	13
1.3.5 Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)	14
1.4 Терапевтические манипуляции	14
1.4.1 Пробиотики	14
1.4.2 Пребиотики	15
1.4.3 Диетическое вмешательство	16
1.4.4 Физическая нагрузка	16
1.4.5 Применение антибиотиков	17
1.5 Стабильность кишечной микробиоты человека	18
1.6 Методы исследования кишечной микробиоты	19
1.6.1 Методы культивирования	19
1.6.2 Высокопроизводительные методы секвенирования	20
1.6.3 Метапротеомные и метаболомные методы	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Сбор образцов	23
2.2 Выделение ДНК	23
2.3 Измерение концентрации ДНК	23
2.4 Электрофорез	25

2.5 Подготовка библиотек для секвенатора Illumina MiSeq	25
2.5.1 Первый раунд ПЦР	25
2.5.2 Очистка ПЦР-продуктов	26
2.5.3 Маркировка индексами и второй раунд ПЦР	27
2.5.4 Количественная и качественная проверка библиотек	27
2.6 Секвенирование	27
2.7 Биоинформатический анализ	27
2.8 Бактериологические посеы	27
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1 Оценка стабильности микробиома по изменению индексов разнообразия	29
3.1.1 Индекс Шеннона	29
3.1.2 Индекс Симпсона	30
3.1.3 OTU (Операционная таксономическая единица)	32
3.2 Оценка стабильности кишечного микробиома на таксономическом уровне	33
3.2.1 Оценка стабильности на уровне фил	33
3.2.2 Оценка стабильности на уровне семейств	35
3.2.3 Оценка стабильности на уровне родов	38
3.3 Характеристика численности и разнообразия культивируемого сообщества энтеробактерий	40
3.4 Сравнительная оценка представленности энтеробактерий культуральными и молекулярными методами	42
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

Кишечная микробиота представляет собой совокупность микроорганизмов, которые населяют кишечник человека. Она образует естественный защитный барьер, а также выполняет структурные и метаболические функции [Lozupone *et al.*, 2012; Reyes *et al.*, 2010]. Исследователи показывают, что безмикробные животные, по сравнению с колонизированными, имеют большую восприимчивость к инфекциям, сниженную активность различных пищеварительных ферментов, более низкий уровень сывороточного иммуноглобулина и более низкую продукцию цитокинов [O'Hara, Shanahan, 2006]. Отклонение состава микробиоты кишечника человека от нормы может служить причиной появления множества различных заболеваний, таких как: диабет, ожирение, воспалительные заболевания кишечника, рак, неалкогольная жировая болезнь печени, аллергии и других [Ursell *et al.*, 2013]. Терапевтические манипуляции обычно сводятся к краткосрочной диете, а также применению антибиотиков, пробиотиков и пребиотиков. Современные исследования показывают, что такое вмешательство не оказывает долговременного эффекта на состав микробиоты кишечника [Khoruts, 2018; Zmora *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018; Lerner *et al.*, 2019; Wiese *et al.*, 2019].

Семейство *Enterobacteriaceae* включает большое количество представителей нормальной кишечной микробиоты человека, а также много патогенных микроорганизмов. Большая часть современных исследований направлена на изучение патогенных штаммов энтеробактерий и механизмов их устойчивости к антибиотикам. Как следствие, существует довольно мало информации об аспектах экологии непатогенных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, их стабильности и распространенности в кишечнике человека [Salosensaari *et al.*, 2021]. *Escherichia coli* один из наиболее известных представителей данного семейства, помимо того, что является

оппортунистическим патогеном человека, также участвует в процессах обмена холина, билирубина и холестерина, а также вырабатывает ряд витаминов и влияет на усвояемость железа и кальция. Более того, кишечная палочка является удобным модельным объектом, так как ее просто культивировать, она растет на относительно дешевых питательных средах, геном и биохимические процессы достаточно хорошо изучены, ряд штаммов *Escherichia coli* безопасен для человека и данный вид не образует агрегатов [Blount, 2015].

Также, в настоящее время нет точной информации о наличии или отсутствии стабильности кишечного микробиома. Некоторые исследователи утверждают, что значительная часть кишечной микробиоты человека очень стабильна и остается неизменной в течение всей взрослой жизни [Caporaso *et al.*, 2011; David *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2018]. Другие, говорят о том, что кишечный микробиом нестабилен и сильно изменяется во времени [Caugant *et al.*, 1981; Jernberg *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008; Zitomersky *et al.*, 2011; Lozupone *et al.*, 2012; Faith *et al.*, 2013].

Таким образом, целью данной работы является исследование внутрииндивидуальной стабильности кишечной микробиоты у условно-здоровых людей.

Задачи:

- 1) Оценка стабильности микробиома по изменению индексов разнообразия;
- 2) Оценка стабильности кишечного микробиома на таксономическом уровне;
- 3) Характеристика численности и разнообразия культивируемого сообщества энтеробактерий;
- 4) Сравнительная оценка представленности энтеробактерий культуральными и молекулярными методами.

ВЫВОДЫ

- 1) При оценке стабильности кишечного микробиома по изменению индексов разнообразия, было показано, что индексы некоторых участников эксперимента были более стабильными во времени. Количество OTU являлось более варибельным показателем, чем индекс Шеннона и индекс Симпсона, что может быть связано со спецификой секвенирования.
- 2) Оценка стабильности кишечного микробиома участников эксперимента на таксономическом уровне показала, что несмотря на варибельность доли представителей микробиоты в сообществе, каждый участник эксперимента обладал индивидуальным таксономическим паттерном.
- 3) При анализе численности семейства *Enterobacteriaceae* в кишечной микробиоте участников, были установлены сильные флуктуации в количестве энтеробактерий у здоровых участников эксперимента. Подавляющее большинство выросших колоний было лактозо-позитивными, лактозо-негативные представители энтеробактерий присутствовали в составе кишечного микробиома респондентов лишь временно.
- 4) Были показаны флуктуации общей доли семейства *Enterobacteriaceae* в микробном сообществе методом секвенирования по 16S, что потенциально связано со спецификой данного метода. У большинства участников эксперимента увеличение/уменьшение доли энтеробактерий в сообществе не коррелировало с числом колоний на чашках, это связано с тем, что метод секвенирования по 16S рНК не отражает количества микроорганизмов. Таким образом, при исследовании необходимо применять оба метода для получения более достоверных результатов.