

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

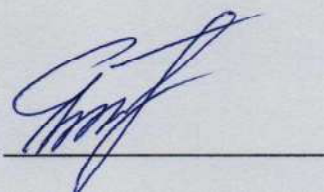
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ACHOLEPLASMA LAIDLAWII К ФТОРХИНОЛОНАМ: ОСОБЕННОСТИ
ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОМНОГО ПРОФИЛЯ ПРИ АДАПТАЦИИ К
ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ

Студент 4 курса

«6» 05 2020 г.

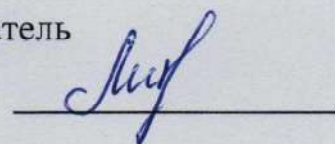


(Я.Н. Бобков)

Научный руководитель:

к.б.н., старший преподаватель

«6» 05 2020 г.

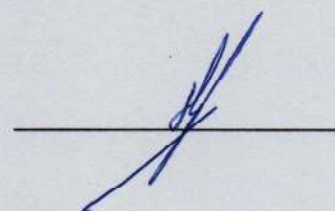


(Е.С. Медведева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«6» 05 2020 г.



(В.М. Чернов)

Казань-2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1.1 Клеточная биология <i>A. laidlawii</i>	8
1.1.2 Молекулярная биология <i>A. laidlawii</i>	10
1.2 Адаптация Mollicutes к антимикробным препаратам.....	12
1.3 Участие внеклеточных везикул в устойчивости бактерий к антимикробным препаратам.....	16
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Культивирование <i>A. laidlawii</i> PG8B на искусственных питательных средах.....	23
2.2. Получение устойчивых к ципрофлоксацину штаммов <i>A. laidlawii</i>	23
2.3 Выделение и очистка внеклеточных везикул штаммов <i>A. laidlawii</i>	24
2.4. Выделение ДНК из внеклеточных везикул штаммов <i>A. laidlawii</i>	24
2.5. Амплификация нуклеотидных последовательностей с помощью полимеразной цепной реакции.....	25
2.6. Выделение и очистка ДНК из клеток штаммов <i>A. laidlawii</i>	27
2.7. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле.	27
2.8. Полногеномное секвенирование, сборка и анализ нуклеотидных последовательностей.....	28
2.9. Определение функций аннотированных генов.....	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	29
3.1 Получение устойчивых к ципрофлоксацину штаммов <i>A. laidlawii</i> PG8 при культивировании бактерии в присутствии и отсутствии внеклеточных везикул микоплазмы	29
3.2. Особенности изменений ДНК-паттернов внеклеточных везикул у <i>A. laidlawii</i> при развитии резистентности к ципрофлоксацину, ассоциированном с культивированием бактерии в присутствии и отсутствии везикул штамма <i>A. laidlawii</i> PG8R ₁₀	31

3.3. Особенности изменения геномного профиля у <i>A. laidlawii</i> PG8 при развитии резистентности к ципрофлоксацину, ассоциированном с культивированием бактерии в присутствии и отсутствии везикул штамма <i>A. laidlawii</i> PG8R ₁₀	34
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49
ПРИЛОЖЕНИЕ	57

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к молекулярно-генетическим основам адаптации представителей класса Mollicutes (микоплазмы) к антибактериальным препаратам обусловлен необходимостью разработок новых и эффективных способов выявления и борьбы с этими микроорганизмами. Микоплазмы повсеместно распространены в природе, выявлены у многих видов эукариот и растений, часть являются опасными патогенами высших эукариот, включая человека, а также контаминантами клеточных культур, которые используются в научных исследованиях и производстве вакцин [Борхсениус *с соавт.*, 2016]. Основным методом подавления микоплазм является антибиотикотерапия. Однако из-за особенностей строения (отсутствие клеточной стенки, маленький размер генома и, соответственно, ограниченные биохимические возможности) многие антимикробные препараты неэффективны в отношении Mollicutes. В настоящее время используют антибиотики групп фторхинолонов, макролидов и тетрациклинов. При этом к этим антимикробным препаратам микоплазмы способны приобретать устойчивость. Недавно было показано на примере *Acholeplasma laidlawii* – «вездесущей» микоплазмы, инфицирующей человека, животных, растения, являющейся также основным контаминантом клеточных культур, что устойчивость к фторхинолонам обеспечивается не только классическими механизмами, присущими другим бактериям: мутации в генах-мишенях антибиотика, участие эффлюксной системы [Чернова *с соавт.*, 2016]. Так, было установлено, что адаптация *A. laidlawii* к ципрофлоксацину сопровождается множественными мутациями в разных генах, ассоциированных как с мишенями фторхинолонов, так и участвующими в фундаментальных клеточных процессах, устойчивости к другим антибиотикам и вирулентности, а также участием внеклеточных везикул, которые содержали в себе детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам – ферменты, разрушающие антибиотики, в отношении которых микоплазмы индифферентны, а также мутантные гены

мишеней фторхинолонов и других антибиотиков. В литературе представлены данные об участии внеклеточных везикул в развитии антибиотикоустойчивости у других бактерий. Везикулы могут транспортировать детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам – гены устойчивости к антибиотикам и ферменты, разрушающие антимикробные препараты и обеспечивать распространение резистентности в бактериальных популяциях [Schaar *et al.*, 2011, 2014; Devos *et al.*, 2016; Rumbo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2015].

Сведения, свидетельствующие о существенных изменениях первичных структур геномов микоплазм в разных условиях среды, в том числе при адаптации к разным антимикробным препаратам, уже появились [Чернов *с соавт.*, 2010, 2011; Медведева *с соавт.*, 2016; Madsen *et al.*, 2008; Kuhner *et al.*, 2009; Chernov *et al.*, 2011; Medvedeva *et al.*, 2014; 2017; Siqueira *et al.*, 2014; Gillespie *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Baranova *et al.*, 2018]. Однако данные о проведении подобных исследований в отношении молекулярных механизмов формирования резистентности микоплазм к антимикробным препаратам, достигнутых разными способами, в том числе ассоциированного с горизонтальным переносом детерминант устойчивости к фторхинолонам через внеклеточные везикулы у микоплазм или других бактерий, пока отсутствуют.

Цель - выявление молекулярно-генетических основ развития резистентности у *Acholeplasma laidlawii* к ципрофлоксацину в присутствии и отсутствии внеклеточных везикул высокорезистентного к ципрофлоксацину штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀.

Задачи:

1. Получить устойчивые к ципрофлоксацину штаммы *A. laidlawii* PG8 при культивировании бактерии в присутствии и отсутствии внеклеточных везикул микоплазмы.

2. Определить особенности изменений ДНК-паттернов внеклеточных везикул у *A. laidlawii* при развитии резистентности к ципрофлоксацину,


ассоциированном с культивированием бактерии в присутствии и отсутствии везикул штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀.

3. Определить особенности изменения геномного профиля у *A. laidlawii* PG8 при развитии резистентности к ципрофлоксацину, ассоциированном с культивированием бактерии в присутствии и отсутствии везикул штамма *A. laidlawii* PG8R₁₀.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Бобков Ярослав Николаевич
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	БОБКОВ Я.Н.
Название файла	БОБКОВ Я.Н..docx
Процент заимствования	21.47 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.31 %
Процент оригинальности	78.22 %
Дата проверки	10:34:22 29 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	29.05.2020  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.