

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**Влияние бактерий рода *Helicobacter* на развитие рака желудка у
лабораторных животных**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

биологического факультета

Курьянович Янины Геннадиевны

Научный руководитель

доцент кафедры биохимии и биофизики,

к.б.н.

 В.А. Великов

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор


20.05.2018 г. С.А. Коннова

Саратов 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время рак желудка занимает пятое место по смертности от онкологических заболеваний [1].

Анализ литературы показал, что до настоящего времени связь между персистенцией бактерий *Helicobacter pylori* (Б. Маршалл, Р. Уоррен, 1982) в желудке человека и развитием рака желудка является недостаточно изученной. Хотя многие исследователи обращают внимание, что она с большой вероятностью может иметь место, достоверных данных, показывающих однозначную корреляцию развития онкологии с наличием в желудочно-кишечном тракте какого-либо штамма *Helicobacter pylori*, в научной литературе не представлено. Однако есть данные о том, что имеется корреляция между персистенцией *Helicobacter pylori* и развитием гастрита, язвенной болезни желудка и других предраковых состояний, а потому поиск такой связи наличия *Helicobacter pylori* и рака желудка остаётся крайне актуальным для последующей диагностики и лечения последнего [2].

На основании изученного материала можно сделать вывод о том, что на данном этапе представляется целесообразным изучение взаимосвязи присутствия бактерий рода *Helicobacter* в желудках лабораторных животных (в частности, крыс) и развитием онкологических заболеваний желудка, поскольку литературными и экспериментальными данными не подтверждено, что конкретно вид *Helicobacter pylori* встречается в желудочно-кишечном тракте крыс.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования было установление взаимосвязи между персистенцией бактерий рода *Helicobacter* в желудках лабораторных животных и развитием рака и предраковых состояний.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Произвести ПЦР с использованием видо- и родоспецифичных праймеров на с целью выявления присутствия хеликобактерии в

желудках лабораторных белых крыс и развитием рака и предраковых состояний.

2. Выявить с использованием метода ПЦР связь между присутствием хеликобактерий в желудках лабораторных белых крыс и развитием рака и предраковых состояний.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились с 2017 года по 2018 год на базе кафедры биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского».

В качестве объекта исследования были использованы самцы белых беспородных крыс возрастом в четыре месяца. В условиях жизни контрольной группы (3 особи) стрессовые факторы отсутствовали. Особи опытной группы (19 особей) в течение девяти месяцев подвергались воздействию химических и социальных стрессирующих факторов в целях инициирования канцерогенеза. В качестве химических стрессирующих факторов в рацион питания опытной группы особей внесены: *m*-толуидин (мета-толуидин) из расчета 25 мкг в день на 1 кг живого веса и нитрит натрия в питьевой воде (в концентрации 0,2%), образующий с вторичными аминами канцероген *N*-нитрозамин. В качестве социального стресса было использовано перенаселение: 50 особей на 1 м².

По окончании подготовительного периода производился высев микрофлоры содержимого желудка на питательную среду и культивирование данной микрофлоры в течение семи дней при температуре 37°C.

Осаждение ДНК при её выделении производили на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Изоляцию ДНК из *Helicobacter* осуществляли с помощью набора для выделения ДНК на сорбенте S-CORB («Синтол», Россия) в соответствии с прилагаемой методикой.

По сравнению с другими, метод ПЦР отличается быстротой; простотой; высокой точностью; высокой чувствительностью — до 93%; максимальной специфичностью — 100%; неинвазивностью; относительно низкой

себестоимостью. Кроме того, метод ПЦР позволяет оценить генотипические и фенотипические характеристики возбудителя.

Для ПЦР использованы следующие праймеры, синтезированные фирмой «Синтол»: видоспецифичные праймеры 23S РНК ((HPY-S) 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3' и (HPY-A) 5'-CGCATGATATTCCCATTA GCAGT-3') и родоспецифичные праймеры 16S рРНК (16-1F, 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3 и 16-1R, 5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3) [3].

Для проведения ПЦР использовали ДНК-амплификатор S1000TM Thermal Cycler (BioRad, США).

ПЦР проводили при следующем режиме: предварительная денатурация матрицы при 95°C – 5 мин, затем следующие 30 циклов – денатурация ДНК при 95°C – 30 с, отжиг праймеров при 53°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин. Окончательная достройка цепей – при 72°C – 5 мин.

После ПЦР проводился горизонтальный агарозный гель-электрофорез в 1%-ном агарозном геле. При проведении электрофореза ДНК в агарозном геле использовали источник тока НИП 300 и электрофорезную камеру (Biosom, Россия). При этом в одну лунку вносилось: 10 мкл ДНК-матрицы опытного либо контрольного образца и 2,2 мкл буферного раствора; либо - 5 мкл маркера молекулярного веса DNA MW Ladder M 100bp (DIALAT Ltd.) и 7.2 мкл дистиллированной воды.

После проведения электрофореза ДНК визуализировали на УФ-трансиллюминаторе УВТ-1 (Biosom, Россия).

Структура и объём работы. Работа изложена на 64 страницах печатного текста и включает в себя введение, три раздела, первые два из которых состоят из четырех подразделов. Кроме того, в основную часть работы включены 7 рисунков и 6 таблиц. Также работа включает в себя заключение, выводы и список использованных источников из 81 наименования.

Положения, выносимые на защиту:

1. В содержимом желудков лабораторных беспородных белых крыс были идентифицированы бактерии рода *Helicobacter* и не были идентифицированы бактерии *Helicobacter pylori*.
2. Существует связь между присутствием бактерий рода *Helicobacter* в желудках лабораторных беспородных белых крыс и развитием предраковых состояний.

Основное содержание работы

В разделе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о бактериях рода *Helicobacter*, в частности, *Helicobacter pylori*, их особенностях и персистенции в желудочно-кишечном тракте. Кроме того, произведён подробный анализ упоминаемых в научной литературе методов выявления бактерий рода *Helicobacter* и на основании него обоснован выбор для проведения исследования именно метода ПЦР. Результаты анализа представлены в таблице 1.

В разделе «Результаты исследования и обсуждение» изложены экспериментально полученные данные о персистенции бактерий рода *Helicobacter* в желудках лабораторных беспородных белых крыс, имевших по результатам длительного стрессирования язвы желудка.

Под стрессом понимается совокупность неспецифических адаптационных реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов-стрессоров, нарушающее его гомеостаз, а также соответствующее состояние нервной системы организма или организма в целом.

Стресс является одним из факторов, прямо или косвенно влияющих на вероятность возникновения и развития раковых заболеваний. Он истощает ресурсы организма, в результате чего снижается эффективность реализации иммунных функций последнего, в том числе функций по защите ДНК от повреждений, репарации ДНК, а также устранению клеток, ДНК которых понесла значительный урон – раковых клеток [4].

Таблица 1 – Сравнение методов выявления бактерий рода *Helicobacter*

Метод	Преимущества	Недостатки
Микробиологический (бактериологический)	- специфичность 100%; - чувствительность более 90%; - позволяет определять антибиотикорезистентность; - позволяет внутривидовое типирование штаммов; - позволяет изучать факторы патогенности.	- отсроченное получение результатов на 7-10 дней; - трудоёмкость; - трудность транспортирования материала для сохранения жизнеспособности микроорганизма; - высокие требования к условиям культивирования; - снижение эффективности высевания при низкой обсеменённости и отсутствии визуальных признаков воспаления; - дорогостоящее оборудование; - неспособность выявлять кокковые формы; - отсутствие стандартизированных методик - временные затраты (24-72 часа до результата); - трудность культивирования и идентификации некоторых
		- микроорганизмов; - вероятность невыявления основного возбудителя инфекции; - трудность оценки чувствительности к новым антибиотикам; - субъективность оценки чувствительности; - использование дорогостоящих сред и реактивов.
Гистологический	- специфичность 97%; - чувствительность 80-90%; - удобство хранения и транспортировки образцов; - возможность проведения ретроспективного анализа; - возможность количественно определить степень обсеменения и морфологические изменения слизистой оболочки желудка; - возможность проведения оценки взаимосвязи между степенью обсеменённости и состоянием СОЖ.	- длительное приготовление парафиновых срезов; - некоторая субъективность в определении степени изменения СОЖ; - невозможность отдифференцировать виды и генотип <i>Helicobacter</i>; - возможность получения ложнонегативных результатов в связи с неправильным забором гистобиопсийного материала, а также наличия участков кишечной метаплазии.

Метод	Преимущества	Недостатки
		погрешностей окраски.
Цитологический	- позволяет существенно уменьшить время получения результатов анализа; - позволяет выявить наличие пролиферативных процессов, неоплазии, метаплазии, дисплазии, оценить степень их выраженности.	- чувствительность — 18-20%.
Уреазный дыхательный тест	- неинвазивность; - даёт представление обо всей СОЖ, а не об отдельном её фрагменте; - чувствительность – 99%; - специфичность — 98%; - ложноположительные результаты считаются редкими (4-10%).	- дорогостоящее оборудование и изотопные препараты.
Аммиачный дыхательный тест	- высокая чувствительность; - быстрота (20 мин); - невысокая стоимость; - совместимость с ЭВМ; - не нуждается в применении изотопов изменённого состава; - позволяет получить результат непосредственно в ходе исследования.	- неудобство использования на лабораторных животных.
Иммуноферментный анализ (ИФА)	- чувствительность — более 90%; - специфичность — более 90%; - меньшая травматичность; - требуется несколько микролитров сыворотки; - возможность одновременного выполнения десятков исследований; - возможность получения результата в короткие сроки (2,5-3 ч); - относительная дешевизна.	- ограниченные возможности исследования крови для оценки эффективности лечения.
Иммуноблотинг	- получения данных о свойствах штамма, продуцирует ли он CagA и VacA.	- высокая стоимость; - трудоёмкость.
ПЦР	- быстрота; - простота; - точность; - чувствительность — 61-93%; - специфичность – 100%; - неинвазивность; - относительно низкая себестоимость;	- низкая специфичность теста на ранних этапах после проведённой антихеликобактерной терапии; - невозможность автоматизации детекции с помощью электрофореза продуктов амплификации;

Метод	Преимущества	Недостатки
	- позволяет оценить генотипические и фенотипические характеристики возбудителя; - возможность использования не только для первичной диагностики, но и для эпидемиологических исследований.	- трудность количественной оценки.

Основные факторы социального стресса в современной цивилизации – это нервное напряжение, избыточное электрическое освещение, перенаселение и шумовое загрязнение. Всё это и многое другое в совокупности приводит к росту числа онкологических заболеваний.

Как известно, наиболее подвержены злокачественному перерождению те ткани организма, в которых происходит самое интенсивное деление. Помимо прочих, к таким тканям относится слизистая оболочка желудка.

В результате рак желудка стал бичом современной цивилизации и проблема его преодоления встает в последнее время особенно остро (рисунки 2, 3).

Для изучения, а также разработки эффективного способа лечения рака желудка у человека в экспериментальных исследованиях чаще всего используется в качестве модельного объекта белая беспородная крыса, поскольку её физиология отвечает требованиям, предъявляемым к такого рода исследованиям [5].

Для нашей работы были выбраны самцы белой беспородной крысы, поскольку мужские особи генетически и физиологически менее устойчивы к различного рода стрессу, а следовательно, таким образом можно получить скорейшие и наиболее наглядные результаты.

В течение 9 месяцев опытная группа крыс подвергалась стрессированию с целью индукции раковых заболеваний желудка.

В качестве социального стрессового фактора выбрано перенаселение из расчета 50 особей на 1 м², поскольку этот фактор является одной из самых острых проблем для человека в настоящее время, решение для которой пока не найдено.

Как фактор химического стресса использовалось добавление в рацион питания крыс нитрита натрия и m-толуидина. Такой выбор был обусловлен следующими причинами.

Нитрит натрия NaNO₂ является сильным восстановителем и используется во многих продуктах питания (в частности, в мясной, колбасной промышленности) в качестве консерванта E250 и фиксатора окраски. Сам по себе он не является канцерогеном, подобные свойства нитрит натрия приобретает при взаимодействии со вторичными аминами в слабокислой среде, являясь причиной образования нитрозаминов.

Нитрозамины обладают высокой токсичностью, им приписывается свойство индукции канцерогенеза.

Для повышения вероятности образования нитрозаминов в питьевую воду стрессируемым крысам добавлялся нитрит натрия в концентрации — 0,2%.

M-толуидин является токсичным веществом и канцерогеном, вызывает поражение внутренних органов, по химической структуре он имеет сходство с пищевыми добавками, которые используются в промышленности для улучшения потребительских свойств продуктов питания.

По истечении срока эксперимента было произведено вскрытие опытной и контрольной групп особей. В результате вскрытия у крыс опытной группы обнаружены язвенные поражения слизистых оболочек желудка.

Для дальнейшего исследования было отобрано содержимое желудков крыс, из образцов которого осуществлен микробиологический посев на чашки Петри (по 2 чашки на 1 образец) и производилось культивирование полученной микрофлоры в течение 1 недели при температуре 37°C.

Для выявления среды выросшей микрофлоры бактерий рода *Helicobacter* выбран метод ПЦР, поскольку, в отличие от остальных методов, применяемых в исследованиях такого рода, он имеет следующие преимущества:

- быстрота;
- простота;
- точность;
- чувствительность – 61-93%;
- специфичность – 100%;
- относительно низкая себестоимость;
- позволяет оценить генотипические и фенотипические характеристики возбудителя.

В ходе работы были использованы видоспецифичные праймеры 23S РНК данной бактерии следующего состава: (HPY-S) 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3', (HPY-A) 5'-CGCATGATATTCCCATTA GCAGT-3', которые не дали положительного результата. Можно предположить, что отрицательный результат на видоспецифичные праймеры обусловлен присутствием других возможных видов бактерий рода *Helicobacter* в желудках крыс.

Кроме того, были использованы родоспецифичные праймеры следующего состава на 16S рРНК данной бактерии 16-1F, 5'-STATGACGGGTATCCGGC-3 и 16-1R, 5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3 [3]. Расчетный размер ПЦР-продукта составил 376 п.н.

В результате ПЦР в содержимом желудков крыс выявлены бактерии рода *Helicobacter* (дорожки/образцы №№ 3-5,8,11,13,15-17,19-22, — рисунок 6, таблицы 4 и 5).

Таблица 4 – Результаты эксперимента

Праймеры	Количество	Количество	Процент
----------	------------	------------	---------

	проанализированных образцов ДНК	положительных результатов	положительных результатов
Видоспецифичные	22	0	0
Родоспецифичные	22	14	64%

Таблица 5 – Результаты ПЦР-анализа с использованием родоспецифичных праймеров

	Количество проанализированных образцов ДНК	Количество положительных результатов	Процент положительных результатов
Контроль	3	1	33%
Опыт	19	13	68%

При выделении ДНК бактерий рода *Helicobacter* наблюдались следующие сложности с использованием смывов содержимого желудков крыс в качестве источника ДНК: рост посторонней микрофлоры, малая доля ДНК *Helicobacter* среди общей ДНК, собираемой с чашки (образцы №№ 7, 9, 11, 14, 16, 18), и в связи с этим возможные ложные результаты ПЦР (таблица 6).

Таким образом, в половине случаев наблюдается совпадение малого высева культуры с отрицательным результатом эксперимента, что позволяет говорить о том, что отсутствие в образце бактерий рода *Helicobacter* может быть связано с малым ростом культуры в соответствующей чашке Петри в целом.

В случае с желудками доля ДНК *Helicobacter* среди общей ДНК также была малой, поскольку в препаратах тотальной ДНК присутствует много ДНК сопутствующей микрофлоры желудка.

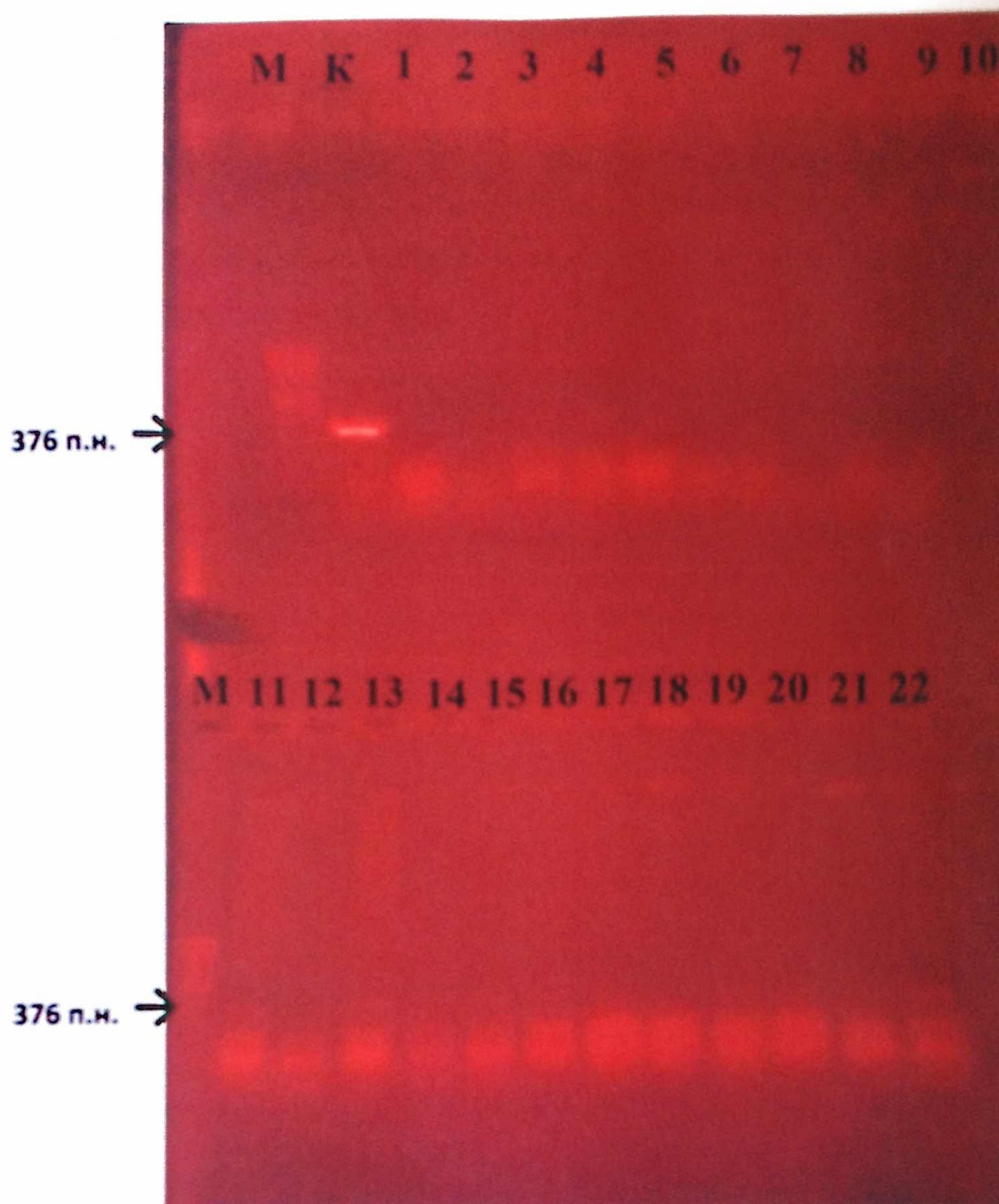


Рисунок 6 – Электрофорез продуктов амплификации гена 16S рРНК с использованием родоспецифичных праймеров. Дорожка М – Маркер молекулярного веса DNA MW Ladder M 100bp (DIALAT Ltd.) Дорожка К – Положительный контроль (ДНК бактерий рода *Helicobacter*). Дорожки 1-3 — Контроль. Дорожки 4-22 – Образцы ДНК из бактерий рода *Helicobacter*, выделенных из содержимого желудков крыс.

Представленные на рисунке 6 результаты соотносятся с результатами вскрытия: в желудках опытных крыс обнаружены язвы.

Таблица 6 – Соотношение между отрицательными результатами обнаружения бактерий рода *Helicobacter* в образцах и малым ростом культур в соответствующих чашка Петри

№ образца	Отрицательный результат	Маленький посев
1	+	
2	+	
3		
4		
5		
6	+	
7	+	+
8		
9	+	+
10	+	
11		+
12	+	
13		
14	+	+
15		
16		+
17		
18	+	+
19		
20		
21		
22		

Выводы:

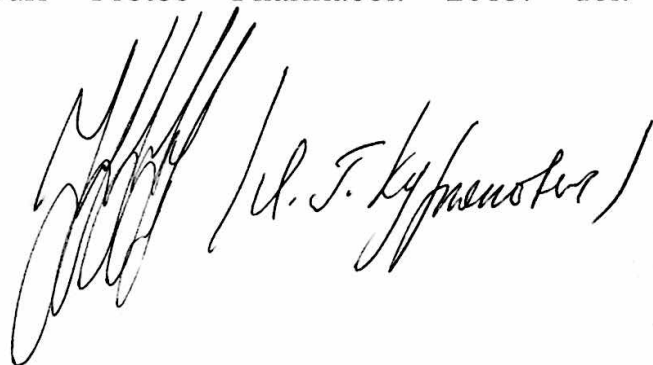
1. В содержимом желудков лабораторных животных методом ПЦР с использованием родоспецифичных праймеров были идентифицированы бактерии рода *Helicobacter*.

2. В содержимом желудков лабораторных животных методом ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров не были идентифицированы бактерии *Helicobacter pylori*.

3. Бактерии рода *Helicobacter* присутствовали в содержимом желудков 68% лабораторных животных с язвами, что может свидетельствовать о связи между присутствием бактерий рода *Helicobacter* в желудках лабораторных белых крыс и развитием предраковых состояний.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Globocan 2015: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2015 // World Health Organization, International Agency for Research on Cancer [Электронный ресурс] : [сайт]. URL: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (дата обращения: 11.06.2018). Загл. с экрана. Яз. рус.
2. Bornschein, J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer / J. Bornschein, P. Malfertheiner // Dig Dis. 2014. V. 32. P. 249-264.
3. Evaluation of 16S rRNA gene-based PCR assays for genus-level identification of *Helicobacter species* / H. Moyaert [et al.] // J Clin Microbiol. 2008. V. 46, N. 5. P. 1867-1869.
4. Berger, T. Beyond the oncogene revolution: four new ways to combat cancer / M.E. Saunders, T.W. Mak // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2016. doi: 10.1101/sqb.2016.81.031161.
5. Murine Models of *Helicobacter* (pylori or felis)-associated gastric cancer / C.A. Duckworth [et al.] // Curr Protoc Pharmacol. 2015. doi: 10.1002/0471141755.ph1434s69.



А. Ф. Курманов