большого мозга и мозжечка с учетом их аккомодации в закрытом пространстве для широкого круга индивидов.

Способ (патент RUS № 2565491, опубл. 20.10.2015) предназначен для дистанционной информационной поддержки оперирующего. Способ включает регистрацию видеоизображения операционного поля, преобразование видеоизображения в цифровой видеопоток, его передачу по каналам связи с преобразованием в видеоизображение для консультанта, дуплексную аудиосвязь хирурга и консультанта. Консультант с камер, закрепленных на оголовье хирурга над его глазами, получает объемные изображения. В ходе операции передают аудио/видеопотоки от хирурга удаленному консультанту и прием аудиопотока от консультанта.

Как показал анализ, конкурентоспособность объектов интеллектуальной собственности для медицины и биомедицины, основанных на использовании искусственного интеллекта, может быть повышена путем патентования научно обоснованных и принципиально новых объектов интеллектуальной собственности. Этим обоснована необходимость проведения исследований в области изучения особенностей и направлений патентования новых объектов интеллектуальной собственности в рассмотренной области науки и техники.

Результаты исследований могут быть использованы для развития базы знаний в области технологий и средств для медицины и биомедицины.

1. Абдулкеримов С.А., Родионов Б.Н., Цыганков В.Д. Использование искусственного интеллекта нейрокompьютера «Эмбрион» для КВЧ-терапии // Известия ТРТУ. 2002. № 3 (26). С. 181-185.
2. Апанель Е.Н., Войцехович Г.Ю., Головки В.А., Мастыкин А.С. Методы искусственного интеллекта в прогнозной диагностике транзиторных ишемических атак (историко-аналитический аспект) // Военная медицина. 2013. № 3 (28). С. 87-91.
3. Калач А.В., Ситников А.И., Перегудов А.Н. Разработка мультисенсорной системы на основе методов искусственного интеллекта для определения некоторых токсикантов в воздухе // Известия ОрГТУ. Серия: Информационные системы и технологии. 2008. № 1-3. С. 88-94.
4. Катасев А.С., Подольская М.А. Новая информационная технология: искусственный интеллект в обработке медицинских данных // Неврологический вестник. 2006. Т. 38. № 3-4. С. 85-90.
5. Корневский Н.А., Филист С.А. Актуальные проблемы биомедицинской инженерии: компьютерные технологии для систем искусственного интеллекта // Актуальные проблемы биомедицинской инженерии: компьютерные технологии для систем искусственного интеллекта. 2012. № 3-4. С. 85-90.
6. Ясницкий Л.Н., Грацилёв В.И., Куляшова Ю.С., Черепанов Ф.М. Возможности моделирования предрасположенности к наркозависимости методами искусственного интеллекта // Вестник Пермского университета. Философия. Психология. Социология. 2015. № 1 (21). С. 61-73.

**Юмагузина Г.К., Зигангирова Н.Н., Ярмухаметова Э.Д.
Молекулярно-генетический анализ частоты встречаемости фрагментов гена
колибактина *E.coli* при воспалительных заболеваниях кишечника**

*Бирский филиал ФГБОУ ВО «Бакирский государственный университет»
(Россия, Уфа)*

doi: 10.18411/lj-11-2020-36

idsp: ljjournal-11-2020-36

Аннотация

В данной статье рассматривается частоты встречаемости фрагментов гена колибактина *Escherichia coli* при воспалительных заболеваниях кишечника. Для эксперимента было использовано 20 образцов биоматериала пациентов, страдающих острыми кишечными заболеваниями, также 2 образца микробных культур, выделенных из биоптатов больных колотеральным раком. Сравнительное изучение различных

штаммов *E.coli*, входящих в состав микрофлоры кишечника у больных с ВЗК, показало, что не все штаммы обладают генотоксичностью.

Ключевые слова: кишечная микрофлора, *E. coli*, ДНК, генотоксичность, воспалительные заболевания кишечника.

Abstract

This article discusses the frequency of occurrence of fragments of the *Escherichia coli* colibactin gene in inflammatory bowel diseases. For the experiment, 20 samples of biomaterial from patients suffering from acute intestinal diseases were used, as well as 2 samples of microbial cultures isolated from biopsy samples of patients with coloteral cancer. A comparative study of various *E. coli* strains, which are part of the intestinal microflora in patients with IBD, has shown that not all strains are genotoxic.

Keywords: intestinal microflora, *E. coli*, DNA, genotoxicity, intestinal diseases.

Введение. Во всем мире в практической гастроэнтерологии одной из наиболее распространенной и острой проблемой являются воспалительные заболевания кишечника (ВЗК). В последние годы внимание нацелено на разработку и внедрение молекулярно-генетических технологий диагностики и прогнозирования риска развития и течения ВЗК. Тем не менее диагностическая ценность опубликованных данных весьма неоднозначна и противоречива, все это может быть вызвано особенностями частоты встречаемости, различиями в патогенетической и клинико-диагностической значимости генетических полиморфизмов в разных странах и регионах проведения исследования [5].

Кишечная микрофлора человека состоит из 100 трлн микроорганизмов, относящихся к 36 000 видов. Микробное население тела человека отличается уникальным разнообразием, так как число и состав микробов в каждом организме индивидуальны. На одну клетку организма человека приходится приблизительно десять бактериальных клеток, а на каждый ген около сотни микробных генов [6]. На протяжении всей жизни на состав микробиома человека влияет ряд физиологических и социальных факторов [2].

Традиционно считается, что микробиом кишечника имеет несколько основных функций: защищает организм от колонизации патогенных микроорганизмов; укрепляет эпителиальный кишечный барьер; способствует абсорбции веществ и улучшению метаболизма [4].

Нарушение сбалансированного состава кишечного микробиома может вызвать хроническое воспаление кишечника - синдром раздраженной кишки (СРК) и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). У пациентов с СРК наблюдается уменьшение бактерий рода *Clostridium* и *Lactobacteria* [3].

Влияние токсинов энтерогенных штаммов могут способствовать возрастанию синтеза провоспалительных цитокинов. Тем самым эти вещества оказывают влияние на межклеточное взаимодействие и внутриклеточную передачу, что провоцируют появление мутаций.

Одной из таких бактерий является *Escherichia coli*. Она синтезирует бактериальный токсин - колибактин, индуцирующий разрывы в ДНК, и приводящий к онкогенным мутациям. А также из семейства *Enterobacteriaceae* представителями носителя колибактина являются *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и *Citrobacter koseri*.

Кишечная палочка является условно-патогенной микрофлорой кишечника, обладающая большим спектром ферментативной активности. Имеет способность осуществлять горизонтальный перенос генетической информации, образовывать биопленки. Факторы патогенности *E. coli*: токсины, инвазины, адгезины, железосвязывающие системы.

В зависимости от вирулентности штамма, те или иные факторы могут по-разному проявляться. Также, некоторым свойствам кишечной палочки уделяется недостаточно внимания. Например, ферментативная активность учитывается только при ряде кишечных заболеваний, когда показана роль лактозонегативных штаммов *E. coli* в развитии диарейного синдрома.

Вирулентность *E. coli* связана исключительно с мобильной частью генома и включения определенных генов могут увеличивать проявление ее активности, приводящее к развитию воспалительных заболеваний кишечника. Одним из таких генов является колибактин.

Колибактин - токсин полипептидной природы, который продуцируют некоторые штаммы сапрофитной кишечной палочки (*E.coli*), нарушающий процесс репликации.

Колибактин работает во время G₂/М клеточного цикла. Он образует ковалентные связи между ароматическими аминами, вызывая мутации, и препятствуют точной репликации ДНК. Этот механизм положен в основу развития рака кишечника [6].

Различные виды кишечной микробиоты были связаны с развитием колоректального рака, но не было продемонстрировано, что бактерии имеют прямую роль в возникновении онкогенных мутаций. *Escherichia coli* может нести остров патогенности *rks*, который кодирует набор ферментов, синтезирующих колибактин. Полагают, что это соединение алкилирует ДНК по остаткам аденина и вызывает двухцепочечные разрывы в культивируемых клетках. Здесь мы подвергаем человеческие кишечные органоиды воздействию генотоксичных *rks* + *E. coli* путем повторной люминальной инъекции в течение пяти месяцев. Полногеномное секвенирование клональных органоидов до и после этого воздействия выявило отчетливую мутационную сигнатуру, которая отсутствовала у органоидов, инъецированных изогенными *rks*-мутантными бактериями. Та же самая мутационная сигнатура была обнаружена в подмножестве 5876 геномов рака человека из двух независимых когорт, преимущественно при колоректальном раке. Наше исследование описывает отчетливую мутационную подпись при колоректальном раке и подразумевает, что лежащий в основе мутационный процесс является прямым результатом прошлого воздействия бактерий, несущих остров патогенности *rks*, продуцирующий колибактин.

Ассоциированные с микробным сообществом механизмы канцерогенеза включают генотоксическое действие ряда бактериальных токсинов, таких как колибактин, цитолетальный растягивающий токсин (cytolethal distending toxin – CDT), цикл-ингибирующий фактор (cycle inhibiting factor – CIF), цитотоксический некротизирующий фактор 1 (cytotoxic necrotizing factor1 – CNF1) [5,7].

Цель исследования: изучения частоты встречаемости фрагментов гена колибактина *Escherichia coli* при воспалительных заболеваниях кишечника.

Материалы и методы исследования. В исследование включены 20 образцов биоматериала (фекалии) пациентов, страдающих острыми кишечными заболеваниями, также 2 образца микробных культур, выделенных из биоптатов больных колотеральным раком. Для выделения бактериальной ДНК из образцов использовали набор "Рибосорб". Амплификацию проводили методом полимеразной цепной реакции на Терцик МС2, детекцию фрагментов ДНК -методом агарозного гель-электрофореза. Размеры фрагментов ДНК оценивали в сравнении со стандартными ДНК маркерами.

Результаты исследования и их обсуждения. Методом ПЦР были исследованы 20 образцов кала и 2 образца биоптата (обработанного). При этом выделяли тотальную ДНК из материала, объемом не больше 200 мкл. В связи с этим, необходимо отметить, что даже при наличии тех или иных микроорганизмов в клиническом материале, они могли быть не идентифицированы. В результате проделанной работы были подобраны праймеры для амплификации *E.coli* ген колибактин.: Clb-F 5'-GCGCATCCT CAAGAGAAATA-3' и Clb-R 5'-GCGCTCTATGCTCATCAACC-3 (рис.1.). Здесь расчетная температура отжига составила 56⁰С, а размер ампликона 280 п.н. (табл.1).

Сравнительное изучение различных штаммов *E. coli*, входящих в состав микрофлоры кишечника у больных с ВЗК, показало, что не все штаммы обладают генотоксичностью. Характерной токсичностью обладает лишь филогенетическая группа В2.

Анализ генов, присутствующих в ядре-геноме, выявил пять основных филогенетических групп, классифицированных как А, В1, В2, D и Е. До 30% штаммов группы В2 переносят в своем геноме кластер *rks* островок.

Таблица 1

Расчетная температура отжига

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров	Тем. отжига	Ожид. размер продукта (пн)
Clb-F	5' – GCGCATCCTCAAGAGAAATA-3'	56°C	280
Clb-R	5' – GCGCTCTATGCTCATCAACC-3'

Рис. 1. Праймеры для амплификации *E.coli* ген колибактин

Заключение. Колибактин оказывает сильное воздействие на иммунитет организма, проницаемость кишечника, вирулентность и влияет на развитие колотерального рака. Изучение биологической активности колибактина представляет особый интерес для понимания его воздействия на микрофлору и организм в целом. Это может привести к разработке адаптированных терапевтических препаратов. Также может помочь нам пересмотреть безвредность кишечных штаммов, которые считались непатогенными.

1. Allen, J. & Sears, C. L. Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development. *Genome Med.* 11, 11 (2019).
2. Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;07(26):11971-11975.
3. Kassinen A., Krogius-Kurikka L., Makivuokko H., Rinttilä T., Paulin L., Corander J., Palva A. The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology.* 2007;133(1):24-33.
4. Round J. L., Mazmanian S. K. Erratum: The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2009;(8):600-600.
5. Кузнецова Д.А., Разумов А.С., Мерзляков М.В., Вавин Г.В., Репникова Р.В. Молекулярно-генетическая диагностика воспалительных заболеваний кишечника. *Альманах клинической медицины.* 2017;45(5):408-415.
6. Кутихин А.Г., Брусина, Е.Б., Попова Ю.А., Южалин А.Е., Животовский А.С., Брико Н.И. Связь микрофлоры толстого кишечника с возникновением колоректального рака. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2012; 4: 44–52.
7. Хайтович А.Б., Воеводкина А.Ю. Микробиом и его влияние на здоровье человека // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2019.