

УДК 616.33/342-002-008.97:579.835.12(575.1)

©Д. А. Далимова¹, А. Абдурахимов¹, Ш. А. Юсупов², Ш. У. Турдикулова³
 Институт биоорганической химии Академии Наук Республики Узбекистан¹
 Самаркандский государственный медицинский институт²
 Учебно-экспериментальный Центр высоких технологий³

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ГЕНОТИПОВ *VAC*A И *CAG*A БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI* С ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В УЗБЕКИСТАНЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ГЕНОТИПОВ *VAC*A И *CAG*A БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI* С ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В УЗБЕКИСТАНЕ – Целью исследования являлось изучение ассоциации генотипов *vacA* и *cagA* *H. pylori* с гастроуденальными заболеваниями в Узбекистане. В качестве материала для исследования были использованы образцы биопсии и желудочного сока, полученные у 102 больных с различными патологиями: 46 – с хроническим эрозивным гастритом (ХЕГ), 36 – с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) и 20 – с раком желудка (РЖ). Статистический анализ частот комбинаций аллелей *s* и *m* показал статистически значимое увеличение частоты встречаемости генотипа *s1m1* у больных РЖ, по сравнению с пациентами с ХЕГ; *s1m2* – у больных ЯБДПК по сравнению с ХЕГ. *Cag+* генотип у пациентов с ЯБДПК и РЖ встречался достоверно чаще по сравнению с пациентами с ХЕГ. Таким образом, генотипирование аллельных вариантов *vacA* и *cagA* *H. pylori* целесообразно включать в скрининговые программы профилактики рака желудка и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в Узбекистане.

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ГЕНОТИПІВ *VAC*A І *CAG*A БАКТЕРІЇ *HELICOBACTER PYLORI* З ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ В УЗБЕКИСТАНІ – Метою дослідження стало вивчення асоціації генотипів *vacA* і *cagA* *H. pylori* з гастроуденальними захворюваннями в Узбекистані. Матеріалом для дослідження слугували 102 зразки біопсії та шлункового соку в пацієнтів з різноманітною патологією, а саме: 46 – хворі на хронічний ерозивний гастрит (ХЕГ), 36 – на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки (ВХДПК) та 20 – з раком шлунка (РШ). Статистичний аналіз частоти комбінацій алелів *s* та *m* показав, що генотип *s1m1* достовірно частіше зустрічається у хворих на РШ, порівняно з пацієнтами з ХЕГ; *s1m2* – частіше зустрічається у хворих з ВХДПК порівняно з ХЕГ. Генотип *cag+* достовірно частіше характерний для пацієнтів з ВХДПК та РШ, ніж для пацієнтів з ХЕГ. Таким чином, генотипування алельних варіантів *vacA* і *cagA* *H. pylori* доцільно включати у скринінгові програми профілактики раку шлунка та виразкової хвороби дванадцятипалої кишки в Узбекистані.

INVESTIGATION OF ASSOCIATION OF *VAC*A AND *CAG*A GENOTYPES OF *HELICOBACTER PYLORI* WITH GASTRODUODENAL DISEASES IN UZBEKISTAN – The aim of our investigation is to study the association of *VacA* and *CagA* *H. pylori* genotypes and gastro-duodenal diseases in Uzbekistan. We investigated 102 samples of biopsy and gastric juice of patients with GIT pathology: 46 patients with erosive gastritis, 36 – had peptic ulcer of duodenum, 20 – stomach cancer. Analysis of frequency combinations of alleles *s* and *m* showed, that *s1m1* genotype is characteristic rather for patients with stomach cancer, then for patients with erosive gastritis; *s1m2* genotype is frequent in patients with peptic ulcer of duodenum comparative with erosive gastritis. Statistically proved that genotype *Cag+* is characteristic more for patients with peptic ulcer of duodenum and stomach cancer than for cases of erosive gastritis. As one can see the genotyping of *VacA* and *CagA* *H. pylori* could be included advisable to screening programs for prevention of stomach cancer and peptic ulcer of duodenum in Uzbekistan.

Ключевые слова: генотип, бактерии, *Helicobacter pylori*, гастроуденальные заболевания.

Ключові слова: генотип, бактерії, *Helicobacter pylori*, гастроуденальні захворювання.

Key words: genotype, bacteria, *Helicobacter pylori*, gastroduodenal diseases.

ВСТУПЛЕНИЕ Грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori* является весьма успешным патогеном персистентно колонизирующим слизистую оболочку желудка человека [1, 2] и на сегодняшний день остается одной из самых распространенных инфекций человека во всем мире [3]. Согласно некоторым данным 50 % населения земного шара инфицированы *Helicobacter pylori* [4], и её распространенность оценивается примерно 25 % в развитых странах и более 80 % в развивающихся странах [5, 6].

При отсутствии антибактериальной терапии, *H. pylori* может персистировать в желудке человека в течение многих десятилетий или даже в течение всей жизни [1]. Для штаммов *Helicobacter pylori* характерна выраженная генетическая гетерогенность, которая может обуславливать разные клинические последствия персистенции этих бактерий. Большинство инфицированных *H. pylori* не имеют клинических проявлений инфекции, т. е. являются бессимптомными носителями данной бактерии или имеют только легкую форму патологии в виде гастрита. Однако только в определенной части инфицированных колонизация слизистой оболочки желудка *H. pylori* может быть причиной возникновения язвенной болезни, а также аденокарциномы желудка и первичной В-клеточной лимфомы [7]. Вариация клинических проявлений геликобактерной инфекции обусловлена многими факторами, включающими сложное взаимодействие между иммунной системой организма, вирулентными факторами возбудителя и нишевыми характеристиками слизистой оболочки желудка [8]. В *H. pylori* было выявлено несколько потенциальных маркеров патогенности, некоторые из которых, вероятно связаны с более тяжелыми клиническими исходами инфекции [7]. Исследования последних лет выявили ряд генов, которые могут играть роль в патогенезе *H. pylori*, такие как *cagA*, *vacA*, *iceA* и *babA* [9]. Гены *vacA* (вакуолизирующий цитотоксинассоциированный ген) и *cagA* (цитотоксинассоциированный ген А) являются наиболее вирулентными генами, которые имеют решающее значение в формировании поражений слизистой оболочки желудка: оба этих гена принимают участие в колонизации и модуляции воспалительной реакции и в развитии воспалительных изменений, язвенной болезни желудка и карциномы [9].

Исследование, направленные на поиск генетических ассоциаций генотипов *H. pylori* с гастроуденальными заболеваниями в разных этнических группах, могут приводить к неоднозначным выводам, что указывает на необходимость с осторожностью переносить результаты, полученные на одной этнической группе, на другие популяции.

Целью нашего исследования являлось изучение ассоциации генотипов *vacA* и *cagA* *H. pylori* с гастроуденальными заболеваниями в Узбекистане.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ В качестве материала для исследования были использованы образцы биопсии и желудочного сока, полученные у больных с различными патологиями гастроэнтерологической этиологии. Всего в работе было использовано 102 образца, из них 46 – с хроническим эрозивным гастритом (ХЕГ), 36 – с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и 20 – с раком желудка (РЖ).

Из собранных материалов методом нуклеосорбции была выделена геномная ДНК и были амплифицированы ген *cagA*, *s* и *m* области гена *vacA* с помощью полимеразной цепной реакции на ДНК амплификаторе PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA). ПЦР проводили с использованием набора GenPak[®] PCR core (ISOGENE, Россия). Условия ПЦР были следующими: для *cagA*: 95 °C – 5 мин, затем 35 циклов: 95 °C – 45 с, 58 °C – 1 мин и 72 °C – 40 с, заключительный цикл – 72 °C – 3 мин; для *s* и *m* областей гена *vacA*: 95 °C – 5 мин, затем 35 циклов: 95 °C – 1 мин, 55 °C – 1 мин и 72 °C – 1 мин, заключительный цикл – 72 °C – 5 мин. Полученные ПЦР продукты разделяли методом электрофореза в 2 % агарозном геле (Helicon, Россия) в последующем окрашивали бромидом этидия и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора "WiseDoc WGD-30" (DAIHAN, Корея). Интерпретацию генотипов проводили на основании различных картин бэндов на электрофореграмме: *cagA*⁺ – 349

п.н. *cagA*⁻ – отсутствие ПЦР продукта, *s*1 – 259 п.н., *s*2 – 286 п.н., *m*1 – 570 п.н., *m*2 – 645 п.н.

Оценку достоверности различий по частотам генотипов *H. pylori* между группами пациентов проводили с использованием точного критерия Фишера (Fisher exact test). Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ Результаты генотипирования представлены в таблице 1. Сравнительный статистический анализ встречаемости *vacAs*1 генотипа между группами пациентов с ХЕГ и ЯБДК не выявил статистически значимых различий ($p = 0,779$ по точному тесту Фишера). Однако в группе больных с РЖ было выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости генотипа *s*1 (100 %) по сравнению с группой пациентов с ХЕГ (78,3 %) ($p = 0,026$ точному тесту Фишера).

Так же мы проанализировали комбинации аллелей сигнального и среднего участков *vacA* гена (рис. 1). В нашем исследовании генотип *s*1*m*1 встречался у 39 % больных с хроническим эрозивным гастритом, в 16,7 % случаях в группе больных с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и у 90 % больных раком желудка. В то время как комбинация *s*1*m*2 была обнаружена у 39; 66,7, и 10 % пациентов с ХЕГ, ЯБДК и РЖ соответственно. Следует также отметить что генотипы *s*2*m*1 и *s*2*m*2 полностью отсутствовали в группе больных РЖ (рис. 2, 3).

Таблица 1. Результаты генотипирования аллельных вариантов *vacA* и *cagA* *Helicobacter pylori* у больных с хроническим эрозивным гастритом, раком желудка и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки

Генотип	Хронический эрозивный гастрит (n=46)	ЯБДК (n=36)	РЖ (n=20)
<i>s</i> 1	36 (78,3 %)	30 (83,3 %)	20 (100 %)
<i>s</i> 2	10 (21,7 %)	6 (17,7 %)	0 (0 %)
<i>m</i> 1	22 (47,8 %)	8 (22,2 %)	18 (90 %)
<i>m</i> 2	24 (52,2 %)	28 (77,8 %)	2 (10 %)
<i>s</i> 1 <i>m</i> 1	18 (39 %)	6 (16,7 %)	18 (90 %)
<i>s</i> 1 <i>m</i> 2	18 (39 %)	24 (66,7 %)	2 (10 %)
<i>s</i> 2 <i>m</i> 1	4 (9 %)	2 (5,6 %)	0
<i>s</i> 2 <i>m</i> 2	6 (13 %)	4 (11 %)	0
<i>CagA</i> ⁺	24 (52 %)	31 (86 %)	16 (80 %)
<i>CagA</i> ⁻	22 (48 %)	5 (14 %)	4 (20 %)

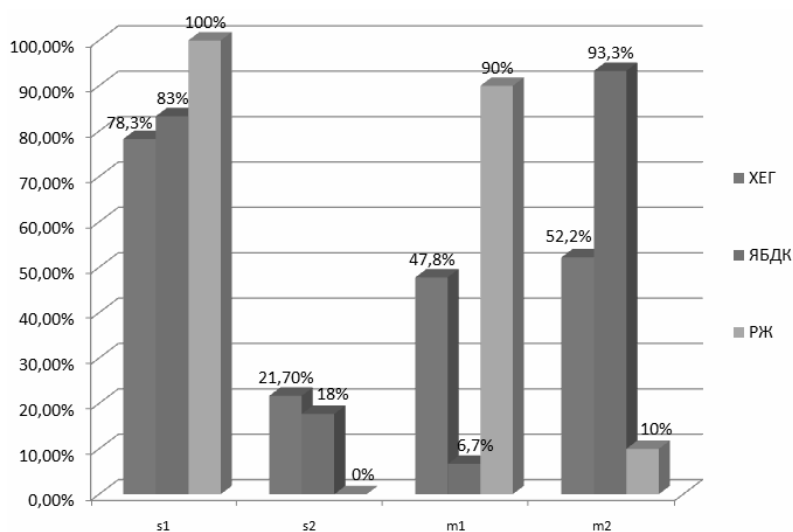
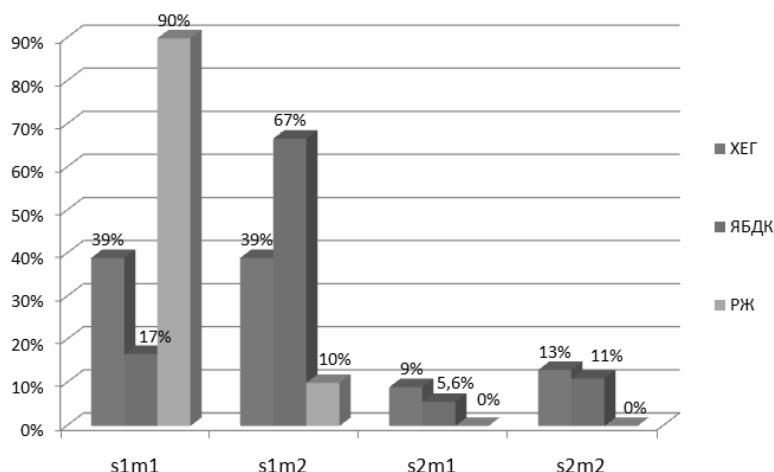
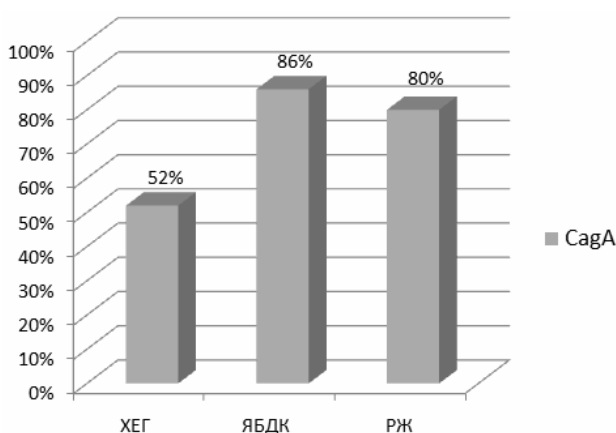


Рис. 1. Распределение вариантов генотипов *vacA* *H. pylori* у пациентов с ХЕГ, ЯБДК и РЖ.

Рис. 2. Распределение комбинации аллелей сигнального и среднего участков гена *vacA* у больных ХЕГ, ЯБДК и РЖ.Рис. 3. Распределение генотипа *cagA*⁺ *H. pylori* у больных ХЕГ, ЯБДК и РЖ.

Статистический анализ частот комбинаций аллелей *s* и *m* показал статистически значимое увеличение частоты встречаемости генотипа *s1m1* у больных РЖ по сравнению с пациентами с ХЕГ ($p=0,0034$ по точному тесту Фишера). Также было выявлено статистически достоверное увеличение встречаемости генотипа *s1m2* у больных ЯБДК по сравнению с ХЕГ. Анализ *cagA*⁺ и *cagA*⁻ генотипов у исследованных групп пациентов выявил статистически достоверное увеличение частоты встречаемости *cagA*⁺ генотипа у пациентов с ЯБДК и РЖ по сравнению с пациентами ХЕГ ($p=0,0018$ по точному тесту Фишера).

Наше исследование показало статистически значимую ассоциацию *s1m1* генотипа *H. pylori* и раком желудка в популяции Узбекистана, что согласуется с предыдущими исследованиями [10, 11].

Ассоциация между генотипом *s1m1* *H. pylori* и ЯБДПК была продемонстрирована в популяции Германии [12] и Голландии [13]. Другие исследования, проведенные в Китае [14, 15] не выявили никакой ассоциации между *vacA* генотипами и ЯБДПК. Однако в нашем исследовании с ЯБДПК оказался ассоциирован генотип *s1m2*. Следует отметить, что в популяции Ирана была также выявлена ассоциация генотипа *s1m2* *H. pylori* и ЯБДПК [16]. В свете этого любопытно отметить историческую и географическую

близость Узбекистана и Ирана, что может указывать на филогенетическую общность штаммов *H. pylori*, циркулирующих в этих странах и как следствие может объяснить общность ассоциаций с гастроудоденальными патологиями. Результаты нашего исследования также логически согласуются с тем фактом, что штаммы *H. pylori* с генотипом *vacA s1m1* и *vacA s1/m2* имеют максимальный и средний уровень секреции цитотоксина, соответственно, тогда как штамм *H. pylori* с генотипом *vacAs2/m2* проявляет незначительную токсическую активность [17]. Выявленная нами ассоциация *cagA* генотипа *H. pylori* с ЯБДПК и РЖ согласуется с данными о том, что *cagA*⁺ and *cagA*⁻ штаммы *H. pylori* существенно различаются по своей биологии. *CagA*⁺ штаммы являются гораздо более интерактивными с организмом хозяина, способны внедрять белок *cagA* в эпителиальные клетки [18, 19] и индуцировать более глубокий тканевой ответ. Кроме того *cagA* усиливает пролиферацию эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта путем активации внутриклеточного сигнального пути Wnt [20], что может объяснить повышенный риск развития РЖ.

Таким образом, результаты нашего исследования указывают на целесообразность включения генотипирования аллельных вариантов *vacA* и *cagA* *H. pylori* в скрининговые программы профилактики РЖ и ЯБДПК в Узбекистане.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scott-Algood H. M. Helicobacter pylori Persistence: An overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses / H. M. Scott-Algood, T. L. Cover // Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 19. – P. 597–613.
2. Kenneth E. L. Helicobacter pylori Infection / E. L. Kenneth // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 362. – P. 1597–1604.
3. Prevalence and clinical relevance of Helicobacter pylori *cagA* and *vacA* genes in Lebanese patients with gastritis and peptic ulcer disease / E-Khayat A. E., A. M. Soweid, M. Kattar [et al.] // J. Infect. Dev. Countries. – 2007. – Vol. 1. – P. 55–61.
4. Windsor H. M. Bacteriology and taxonomy of Helicobacter pylori / H. M. Windsor, J. O'Rourke. Gastroenterol Clin North Am. – 2000. – Vol. 29(3). – P. 633–648.
5. Jafarzadeh A. Specific serum immunoglobulin G to *H. pylori* and *cagA* in healthy children and adults (South-East of Iran) / A. Jafarzadeh, M. T. Rezayati, M. Nemati // World. J. Gastroenterol. – 2007. – Vol. 13. – P. 3117–3121.

6. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan / H. J. Lin, C. L. Perng, W.C. Lo [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 10. – P. 2493–2497.
7. *Helicobacter pylori* genotypes in Lithuanian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer / J. Miciuleviciene, H. Calkauskas¹, L. Jonaitis [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2008. – Vol. 44. – P. 449–454.
8. Association of *H. pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases / E. Kamali-Sarvestani, A. Bazargani, M. Masoudian [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12. – P. 5205–5210.
9. Yoshio Yamaoka. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors / Yoshio Yamaoka // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2010 Nov. – Vol. 7(11). – P. 629–641.
10. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? / M. Kidd, A. J. Lastovica, J. C. Atherton, J. A. Louw // *Gut*. – 1999. – Vol. 45. – P. 499–502.
11. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany / S. Miehke, C. Kirsch, K. Agha-Amiri [et al.] // *Int J Cancer*. 2000 Aug 1. – Vol. 87(3). – P. 322–327.
12. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori* / J. C. Atherton, R. M. J. Peek, K. T. Tham [et al.] // *Gastroenterology*. – 1997. – Vol. 112. – P. 92–99.
13. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori* / L. J. Van Doorn, C. Figueiredo, R. Sanna [et al.] // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 115. – P. 58–66.
14. Regional Variation among vacA Alleles of *Helicobacter pylori* in China / J. Wang, van L.-J Doorn, P. A. Robinson [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41 (5). – P. 1942.
15. Distribution of Distinct vacA, cagA and iceA Alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong / B. C. Y. Wong, Y. Yin, D. E. Berg [et al.] // *Helicobacter*. – 2001. – Vol. 6 (4). – P. 317.
16. Abbas Doosti and Pooria Ghasemi-Dehkordi. *Helicobacter pylori* vac A Genotypes in Shahrekordian (Iran) *H. pylori*-Positive Patients // *Research Journal of Biological Sciences*. – 2009. – Vol. 4. – P. 11–15.
17. Cover T. L. Purification and characterisation of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* / T. L. Cover, M. J. Blaser // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 10570–10575.
18. Translocation of *Helicobacter pylori*: CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion / S. Odenbreit, J. Puls, B. Sedlmaier [et al.] // *Science*. – Vol. 2000. – Vol. 287. – P. 1497–1500.
19. Gordon D. CagA protein from *Helicobacter pylori* is a Trojan Horse to epithelial cells / D. Gordon // *Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 118(5). – P. 817.
20. *H. pylori* virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model Dis / James T. Neal, Tracy S. Peterson, Michael L. Kent, Karen Guillemin // *Model. Mech.* – 2013. – Vol. 6. – P. 802–810.

Отримано 19.02.15