

ЧАСТОТА ГЕНОВ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ H. PYLORI У ПАЦИЕНТОВ С ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ И ИХ СВЯЗЬ С КЛИНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

О.О. Янович¹, Л.П. Титов¹, М.В. Дорошко²

¹*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Беларусь*

²*Медицинский центр «Нордин», г. Минск, Беларусь*

Резюме: Целью работы было оценить частоту выявления генов острова патогенности *saqPAI* у пациентов с хеликобактериозом и установить связь с формой заболевания. Установлено, что частота встречаемости *saqA* была высокой вне зависимости от локализации патологического процесса (93,7% при язве двенадцатиперстной кишки и 78,8% при хроническом гастрите). Статистический анализ показал, что риск развития язвы двенадцатиперстной

кишки возрастает в 6,5 раза при наличии гена *cagT* острова патогенности НР (ОШ=6,5).

Ключевые слова: *H. PYLORI*, ГЕНЫ ОСТРОВА ПАТОГЕННОСТИ

Summary: The aim of this study was to estimate association between *H. pylori* *cagPAI* genes from patients with gastroduodenal diseases and clinical outcome. The *cagA* gene was identified in 78.8% and 93.7% biopsies from patients with gastritis and peptic ulcer, respectively. Comparison of *H. pylori* from patients with gastroduodenal diseases showed significant associations of *cagT* with duodenal ulcer (OR=6.5]

Keywords: *H. PYLORI*, *CagPAI*

Введение. *H.pylori* (НР) является одним из наиболее широко распространенных на земном шаре патогенов. Высокая распространенность НР обусловлена гетерогенностью генома, что является результатом адаптации бактерии к условиям желудка хозяина и действия иммунной системы в ответ на инфекцию. Хронический хеликобактериоз развивается у чувствительных индивидуумов и клинически выражается от поверхностного гастрита до злокачественных новообразований желудка. Тяжесть клинического течения хеликобактериоза во многом зависит от степени патогенности штаммов возбудителя, что, в свою очередь, определяется наличием и особенностями цитотоксических генов.

Наибольшую значимость среди факторов вирулентности НР исследователи отводят острову патогенности *cag* (*cag pathogenicity island* - *cag PAI*), представляющему собой генетически вариабельный участок. Это геномный регион *H. pylori* примерно 40 т.п.о. ограниченный транспозируемыми элементами с горизонтальным переносом. Он содержит 31 ген, включая 6 генов с названием *cag* (цитотоксин-ассоциированный ген). *cagPAI* кодирует белки транспортной системы IV типа способствующие проникновению НР в цитозоль эпителиальных клеток желудка [1, 2].

Данные об ассоциации генов *cagPAI* с клиническим течением заболевания противоречивы – некоторые работы показывают такую связь [3], другие нет [4].

Цель работы - оценить частоту выявления генов острова патогенности *cagPAI* у пациентов с хеликобактериозом и установить связь с формой заболевания.

Материалы и методы. Было проведено исследование биопсийного материала желудка 85 человек с различными формами хронического гастрита (ХГ) (51 женщина и 34 мужчины, ср. возраст 40,4±1,4 лет) и 23 пациентов с язвой двенадцатиперстной кишки (ДПК) (10 женщин и 13 мужчин, ср. возраст 40,5±2,6 лет). Материалом для исследования служила ДНК *H. pylori* выделенная из биоптатов антрального отдела слизистой оболочки желудка,

полученных во время гастродуоденофиброскопии. При проведении эндоскопии выделяли 3 степени активности воспалительного процесса: низкую, умеренную и выраженную. Материал был получен в эндоскопическом отделении медицинского центра «Нордин» г. Минска.

Определение *H. pylori* в биопсийном материале методом ПЦР. Экстракцию ДНК НР из биопсийного материала проводили с использованием набора «ДНК-сорбВ» (Амплисенс, Россия), в соответствии с инструкцией производителя.

Для амплификации фрагмента гена 23S рРНК НР длиной 267 п.о. использовали последовательности: 5'-AGGTТАAGAGGATGCGTCAGTC-3' (F) и 5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3' (R) (GenBank №U27270). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Для определения генов острова патогенности использовали последовательности представленные в таблице 1.

Таблица 1 - Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генов *cagPAI*

Ген	Последовательность праймеров	Размер фрагмента
<i>cagA</i>	F – 5' – AAT ACA CCA ACG CCT CCA AG – 3' R – 5' – TTG TTG CCG CTT TTG CTC TC – 3'	400 п.о.
<i>cagM</i>	F – 5' – ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC – 3' R – 5' – ATTTTCAACAAGTTAGAAAAAGCC – 3'	586 п.о.
<i>cagT</i>	F – 5' – CСATGTTTATACGCCTGTGT – 3' R – 5' – CATCACCACACCSTTTTGAT – 3'	301 п.о.

Амплификация проводилась в автоматическом режиме по заданным программам. Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Статистическая обработка данных. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение и доли от общего числа. Для сравнения долей применялся анализ таблиц сопряженности с вычислением статистик связи (с поправкой Йэйтса) и точный критерий Фишера, ОШ – соотношение шансов (STATISTICA 8.0). Разница считалась достоверной при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Распределение изученных образцов в зависимости от наличия *cagPAI* генов представлены на рисунке 1.

В проведенном исследовании ген *cagA* встречался с высокой частотой у пациентов с воспалительными заболеваниями желудка и ДПК: при ХГ - 80%, при язве ДПК- 91,3%.

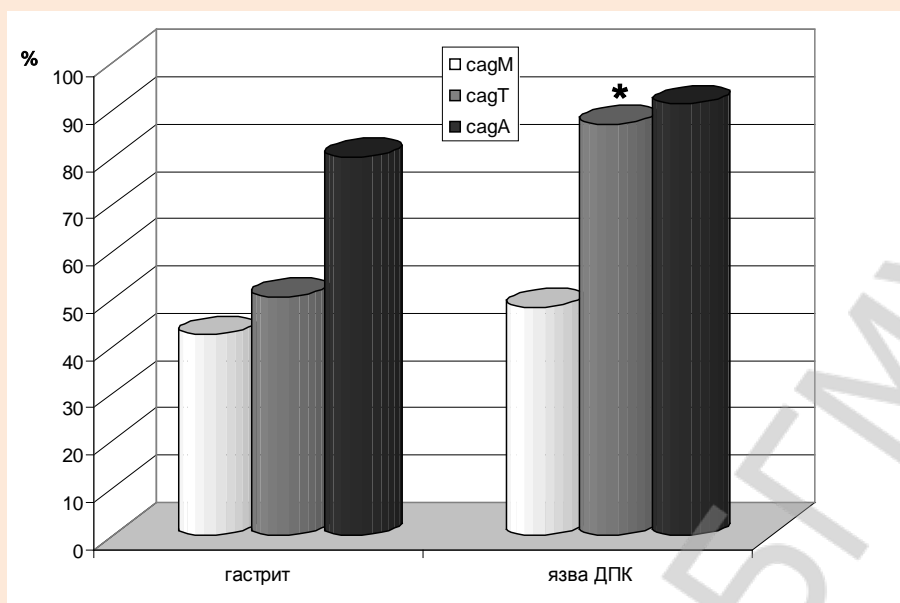


Рисунок 1 – Частота встречаемости генов cagPAI в зависимости от заболевания желудка

Примечание - * - достоверно при сравнении с группой больных ХГ, $p < 0,05$

CagA является одним из важнейших генов входящих в остров патогенности и большинством исследователей считается маркером наличия cagPAI [5]. Вместе с тем, некоторые исследования показывают, что ген cagA как маркер острова патогенности cagPAI не обладает достаточной значимостью по ряду причин: (а) инактивация cagE, а не cagA достоверно снижает секрецию ИЛ-8 эпителиальными клетками желудка [6]; (б) отсутствие гена cagA не всегда указывает на отсутствие острова патогенности cagPAI [7]. В нашем исследовании частота встречаемости cagA была высокой вне зависимости от локализации патологического процесса.

По литературным данным другие гены cagPAI также связаны с риском развития неблагоприятного течения воспалительного заболевания желудка. По результатам исследования в Японии установлено, что штаммы с отсутствием cagE и cagT, выявлялись чаще у пациентов с хроническим гастритом, по сравнению с язвой желудка или раком [8]. В Англии большинство штаммов НР у пациентов с язвой желудка сохраняют гены cagT и cagE. Наличие гена cagT увеличивало риск заболевания язвой в 27 раз, а cagM в 8 раз [9].

В проведенном нами исследовании частота встречаемости гена cagT достоверно выше у пациентов с язвой ДПК по сравнению с ХГ, 87% против 50,5% ($p < 0,05$, ОШ=6,5, ДИ – 1,6–29,8). Частота выявляемости гена cagM ниже по сравнению с другими генами cagPAI и составила 42,4% и 78,3% у больных ХГ и язвы ДПК, соответственно.

На связь гена *cagT* с неблагоприятным прогнозом развития хеликобактериоза указывает достоверная корреляция активности воспалительного процесса в желудке с присутствием указанного гена у пациентов с язвой ДПК ($p < 0,05$).

Многими исследователями установлено, что экспрессия хеликобактером генов *cagPAI* достоверно связана с развитием язвы, но клинический исход инфекции по отдельным генам трудно предсказать [10, 11]. Анализ наших данных показал, что в образцах биопсий взятых у пациентов с язвой ДПК достоверно чаще определяются все три гена острова патогенности *cagPAI* по сравнению с больными ХГ – 73,9% против 31,8%.

Выводы. Течение хеликобактериоза представляет собой результат сложного взаимодействия между бактерией и слизистой желудка хозяина. Генетическая вариабельность и аллельные формы генов расширяют круг потенциально вирулентных штаммов, что затрудняет определение дальнейшего клинического прогноза у пациентов инфицированных *H. pylori*. В проведенном исследовании установлено, что в обследованной группе пациентов фактором риска развития язвы ДПК является ген острова патогенности *cagT*. Его присутствие у бактерии увеличивает риск развития заболевания в 6,5 раз.

Углубленное изучение факторов патогенности *H. pylori*, определение генотипов бактерии даст возможность разработать тактику лечения больного и предложить рекомендации по дальнейшему наблюдению за течением заболевания, поможет лечащему врачу выявить группы риска.

Литература

1. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography / A. Covacci [et al.] // Science. – 1994. – Vol.284. – P.1328-1333.
2. Covacci, A. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell / A. Covacci, R. Rappuoli // J. Exp. Med. - 2000. – Vol.191. – P.587–592.
3. Чуков, С.З. Определяют ли факторы вирулентности *H. pylori* характер гастродуоденальной патологии? / С.З. Чуков, В.Д. Пасечников // Рос. жур. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2001. - Т.11, №2. - С.74.
4. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island / P.-I. Hsu [et al.] // Am. J. Gastroenterol. – 2002. – Vol.97. – P.2231–2238.
5. *CagA* and *VacA* genotypes in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia: a case-control study / H. FakhreYaseri [et al.] // Med. J. Islam. Repub. Iran. – 2014. - №28. – P.104.
6. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* / N.S.Akopyants [et al.] // Mol. Microbiol. - 1998. – Vol.28. – P.37–53.
7. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates / S. Maeda [et al.] // Gut. - 1998. – Vol.44. – P.336–341.

8. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan / S. Yamazaki [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2005. – Vol.43, №8. – P.3906-3916.

9. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England / F. Kauser [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2005. – Vol.5. – P.32.

10. Ethnicity association of *Helicobacter pylori* virulence genotype and metronidazolesusceptibility / H. Alfizah [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol.19, №8. – P.1283-1291.

11. *Helicobacter pylori* genotypes in Lithuanian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer / J. Miciuleviciene [et al.] // *Medicina (Kaunas).* – 2008. – Vol.44, №6. – P.449-454.