

Н.Н. Готовцев, Н.А. Барашков, Т.В. Борисова, М.В. Пак, М.П. Алексеева, Н.Н. Иннокентьева, К.С. Лоскутова, В.Г. Пшеничникова, А.М. Рафаилов, С.Н. Леханова, С.А. Федорова

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ЯКУТИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ЦИТОТОКСИН-АССОЦИИРОВАННОГО ГЕНА A (CAG) В ГЕНОМЕ *HELICOBACTER PYLORI*

DOI 10.25789/YMJ.2018.63.03

УДК 616.34 (571.56)

В статье приводятся результаты изучения клинического течения гастродуоденальных заболеваний в Якутии в зависимости от наличия цитотоксин-ассоциированного гена A (*cagA*) в геноме *Helicobacter pylori*. Показана связь между *cagA*⁺ штаммами и более тяжелым клиническим течением гастродуоденальных заболеваний (эрозивно-язвенные поражения) у пациентов с *Helicobacter pylori* в Якутии.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, гастродуоденальные заболевания, ген *cagA*, Якутия.

In this paper we presented the results of the study of clinical outcomes in patients with gastroduodenal diseases in Yakutia depending on the presence of the cytotoxin-associated gene A (*cagA*) in *Helicobacter pylori* genome. The relationship between *cagA*⁺ strains and more severe clinical outcomes (erosion and ulcers) in patients with gastroduodenal diseases associated with *Helicobacter pylori* in Yakutia has been shown.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastroduodenal diseases, *cagA* gene, Yakutia.

Введение. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является одним из наиболее распространенных бактериальных патогенов человека, который распространен по всему миру [20]. Инфекция *H. pylori* связана с развитием хронического гастрита, язвы желудка или двенадцатиперстной кишки, рака желудка и MALT-лимфомы [5, 12, 28]. При отсутствии лечения индивиды, которые были инфицированы *H. pylori*, в течение жизни остаются колонизированными этим видом из-за повышенной жизнестойкости и приспособляемости возбудителя [4]. Ранее были описаны различные гены вирулентности и патогенности инфекции *H. pylori*, такие как *cagA*, *vacA*, *iceA* и *oipA* [6, 8, 10, 14]. Цитотоксин-ассоциированный ген A (*cagA*) часто ассоциируется с образованием цитотоксинов и индукцией интерлейкина 8 (IL8) желудочными эпителиальными клетками [19]. Большинство проведенных исследований показало, что при наличии у

H. pylori белка *CagA*, относительный риск более тяжелых течений гастродуоденальных заболеваний увеличивается в 2-3 раза [6, 15, 18]. Кроме того, некоторые данные указывают на возрастание риска рака желудка при инфицировании *cagA*⁺ штаммами *H. pylori* в 28,4 раза [24]. Установлено, что *cagA*⁺ штаммы *H. pylori* также связаны с более выраженным воспалением, пролиферацией клеток и метаплазией слизистой оболочки желудка [25]. Первым значительным прорывом в изучении белка *CagA* было осознание того, что его ген является частью большого так называемого островка патогенности (*cag* PAI) – области горизонтально приобретенной ДНК, которая встроена в геном более вирулентных штаммов *H. pylori* [7]. Существует гипотеза, что *cag* PAI *H. pylori* служит транспортной системой для других генов-факторов вирулентности [13]. Кроме прямого влияния белков *CagA* на эпителиальные синапсы, передачу импульсов фактора роста и цитоскелет *CagA* также имеет выраженный провоспалительный эффект [21]. В настоящее время актуальным является изучение распространенности гена *cagA* и его

ассоциации с клиническим течением гастродуоденальных заболеваний в разных странах мира. Так, например, в некоторых исследованиях показано, что наличие гена *cagA* связано с язвенными заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки [2, 16, 26]. Клиническое течение гастродуоденальных заболеваний у пациентов в Якутии в зависимости от наличия цитотоксин-ассоциированного гена A в геноме *H. pylori* ранее не было изучено и стало целью настоящей работы.

Материалы и методы. Были использованы образцы гастробиоптатов, полученных в период с апреля 2014 по январь 2018 г. у 311 пациентов, поступивших на фиброгастродуоденоскопию (ФГДС) в эндоскопическое отделение Государственного автономного учреждения Республики Саха (Якутия) «Республиканская больница №1-Национальный центр медицины» (РБ №1-НЦМ). Для подтверждения наличия инфекции *H. pylori* гастробиоптаты были отправлены на гистологическое исследование в патологоанатомический отдел РБ №1-НЦМ. По результатам гистологического заключения в исследование были включены 172

Таблица 1

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для детекции гена *cagA* *H. pylori*

Ген, фрагмент	Название олигонуклеотидного праймера	Последовательность от 5' → 3' конца	Размер амплифицируемого фрагмента
<i>cagA</i>	<i>cagA</i>	5'-GATAACAGGCAAGCTTTT-3' R5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAG-3'	349 п.н.

ЯНЦ КМП: ГОТОВЦЕВ Ньургун Наумович – н.с., БАРАШКОВ Николай Алексеевич – к.б.н.-руковод.лаб., ПШЕНИКОВА Вера Геннадиевна – к.б.н.-руковод.лаб.; СВФУ им. М.К. Аммосова: БОРИСОВА Туяра Валерьевна – студент, ИННОКЕНТЬЕВА Наталья Николаевна – аспирант, РАФАИЛОВ Адюм Михайлович – к.б.н., доцент, ЛЕХАНОВА Саргылана Николаевна – к.м.н., доцент, ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна – д.б.н., зав. лаб.; РБ №1-НЦМ: ПАК Мария Владимировна – врач-эндоскопист, АЛЕКСЕЕВА Мавра Павловна – врач-эндоскопист, ЛОСКУТОВА Кюнняя Саввична – к.м.н., зав. патологоанатомич. отд., доцент СВФУ.

пациента (из 311 обследованных), у которых было выявлено наличие *H. pylori*. Средний возраст составил 24,7 года (от 3 до 70 лет). Пациенты были подразделены на две группы: хронический гастрит и хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями.

Геномная ДНК *H. pylori* была выделена из замороженных гастробипоптатов обследованных пациентов с помощью фенольно-хлороформной экстракции [9]. Амплификация искомым фрагментов ДНК *H. pylori* была выполнена с помощью олигонуклеотидных праймеров, предложенных ранее (табл.1), которые фланкируют область, содержащую ген *cagA* [27]. Полимеразная цепная реакция проведена на амплификаторе фирмы «Bio-Rad». Разделение продуктов амплификации осуществлено в горизонтальных электрофорезных камерах в 2%-ном агарозном геле. Визуализация продуктов ПЦР осуществлена при помощи системы гель-видеодокументации фирмы «Bio-Rad» с использованием программного обеспечения Image Lab™ Software.

Обследования, предусмотренные рамками научно-исследовательской работы, проводились строго после информированного согласия участников, родителей (законных представителей) несовершеннолетних пациентов без нарушений этических норм. Данная научно-исследовательская работа была одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике Якутского научного центра комплексных медицинских проблем. (Выписка из протокола №41 от 12 ноября 2015 года. Решение №5).

Результаты. В ходе проведенного эндоскопического и гистологического исследования у 172 (55,3%) из 311 индивидов при гистобактериологическом исследовании было подтверждено наличие *H. pylori* (рис. 1, а). Диагноз хронический гастрит был установлен в 91 случае (52,9%), а диагноз хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями – в 81 случае (47,1%) (рис. 1, б). Штаммы, имевшие *cagA* статус, были идентифицированы в 118 образцах (68,6%), а *cagA*- статус – в 54 (31,4%) (рис. 1, в).

Рис.2. Сравнительный анализ течения гастродуоденальных заболеваний в зависимости от наличия у пациентов гена *cagA*: а) по месту рождения/проживания; б) в зависимости от пола пациентов; в) в зависимости от возраста (дети/взрослые); г) в зависимости от установленного диагноза.

Примечание. ♂ – мужской пол, ♀ – женский пол

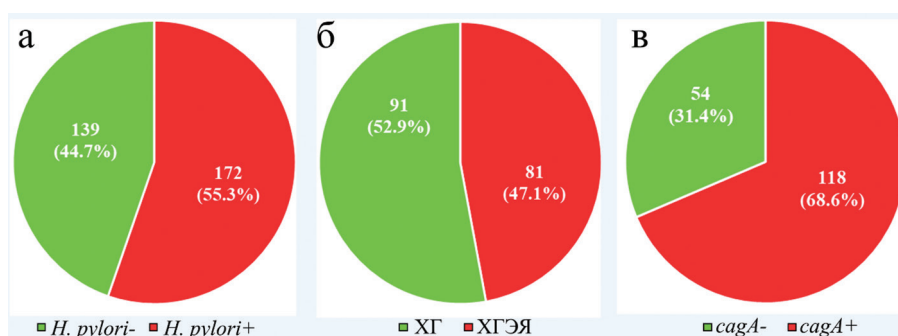
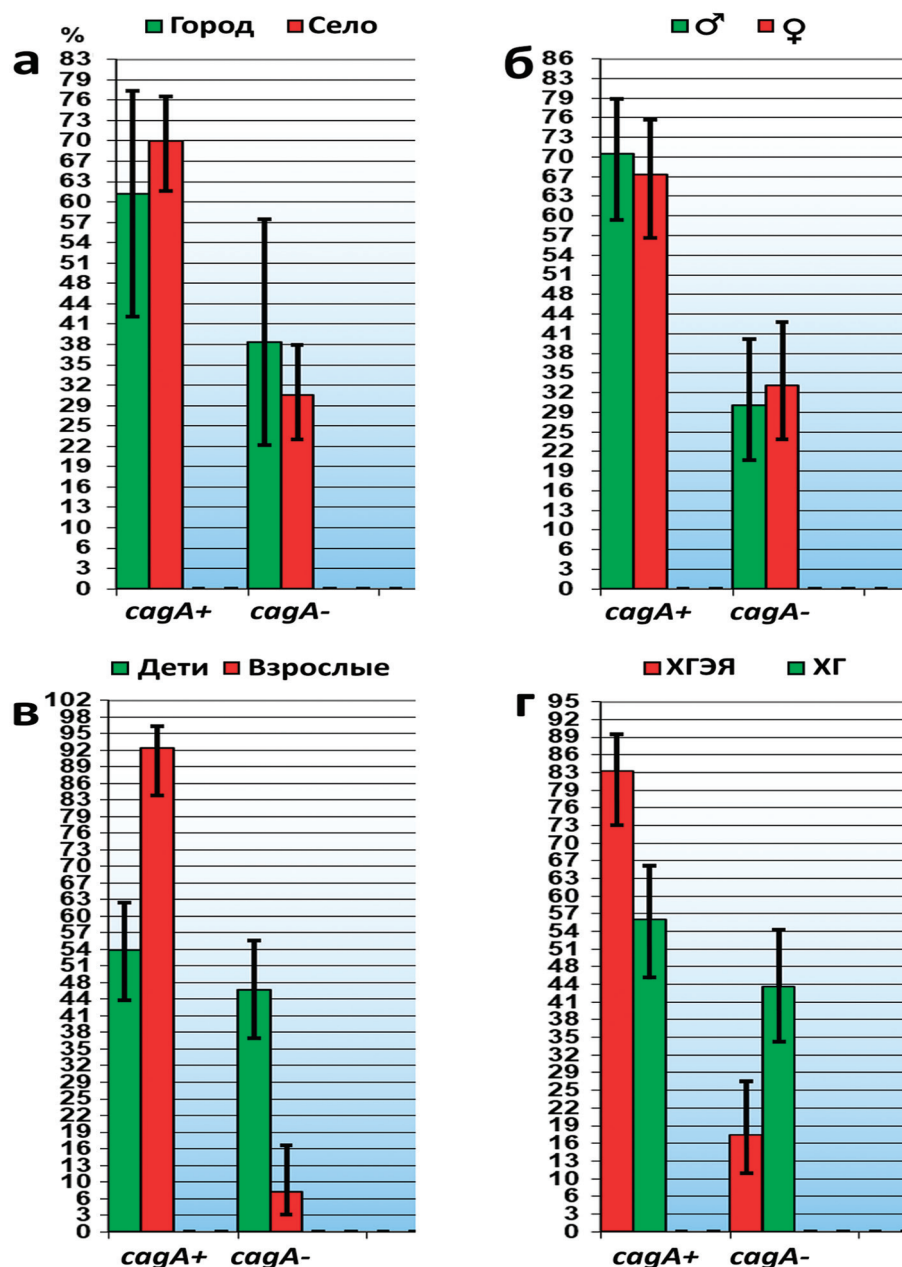


Рис.1. Результаты эндоскопического, гистологического и молекулярно-генетического исследования: а – количество пациентов, инфицированных *H. pylori*; б – частота встречаемости выборки пациентов по клиническим диагнозам в зависимости от наличия или отсутствия эрозивно-язвенных проявлений; в – выборка пациентов, имевших различные штаммы *H. pylori*.

Примечание. На рис. 1-2 ХГЭЯ – хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями; ХГ – хронический гастрит; *cagA* – штаммы, имеющие ген *cagA*; *cagA*- – штаммы, не имеющие ген *cagA*



Достоверных отличий в клиническом течении гастродуоденальных заболеваний у пациентов, инфицированных *sagA*⁺ или *sagA*⁻ штаммами *H. pylori*, в зависимости от пола, а также места рождения и проживания нами не было получено ($p>0,05$) (рис. 2, а, б). Однако были показаны статистически значимые отличия между выборками взрослых и детей в зависимости от наличия *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммов *H. pylori*. Так, в группе от 18 до 70 лет встречаемость *sagA*⁺ штаммов была более высокая по сравнению с группой пациентов от 3 до 17 лет, у которых чаще встречались *sagA*⁻ штаммы ($p<0,001$) (рис. 2, в).

Также достоверные отличия в клиническом течении гастродуоденальных заболеваний в зависимости от наличия *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммов *H. pylori* ($p<0,001$) были обнаружены в группе сравнения. Было установлено, что *sagA*⁺ штаммы достоверно чаще встречались в выборке пациентов с диагнозом хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями желудка и двенадцатиперстной кишки, чем у пациентов с диагнозом хронический гастрит, у которых чаще встречались *sagA*⁻ штаммы ($p<0,001$) (рис. 2, г).

Был выполнен перекрестный анализ пациентов по наличию *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммов с учетом возраста и установленных диагнозов. Статистически значимые отличия в клиническом течении внутри группы детей были найдены при перекрестном сравнении *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммов (табл.2). Так, в выборке детей с диагнозом хрониче-

Перекрестное сравнение клинического течения внутри группы детей и взрослых по *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммам

Дети (n=105)	Хронический гастрит (n=67)	cagA+	29 (43,3%)	$\chi^2=9,03$ p<0,001
		cagA-	38 (53,7%)	
	Хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями (n=38)	cagA+	28 (73,7%)	
		cagA-	10 (26,3%)	
Взрослые (n=67)	Хронический гастрит (n=24)	cagA+	22 (91,6%)	$\chi^2=0,018$ p>0,05
		cagA-	2 (8,4%)	
	Хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями (n=43)	cagA+	39 (90,7%)	
		cagA-	4 (9,3%)	
Итого: 172				

ский гастрит с эрозивно-язвенными поражениями достоверно чаще встречались *sagA*⁺ штаммы ($\chi^2=9,03$, $p<0,001$) (73,7%). В выборке взрослых достоверных отличий в клиническом течении не было обнаружено ($\chi^2=0,018$, $p>0,05$).

Обсуждение. Распространенность *sagA*⁺ штаммов *H. pylori* среди пациентов с гастродуоденальными заболеваниями различается в разных странах мира [11]. В Якутии частота *sagA*⁺ штаммов *H. pylori* у пациентов с гастродуоденальными заболеваниями составила 68,6%. Этот результат соответствует частоте *sagA*⁺ штаммов в Тунисе [22], Египте [11], Палестине, Иране, Испании и Великобритании [список литературы доступен по запросу]. Однако полученная частота *sagA*⁺ штаммов *H. pylori* в Якутии ниже, чем в некоторых странах Южной Америки, Африки, Европы, Азии, и выше, чем в некоторых странах Северной Америки, Африки, Ближнего Востока и Европы (рис. 3).

При анализе выборки пациентов, инфицированных *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммами *H. pylori*, были найдены статистически значимые отличия в группе сравнения пациентов в зависимости от наличия эрозивно-язвенных проявлений (рис. 2, г). Так, у пациентов, имеющих эрозивно-язвенные поражения, достоверно чаще встречались *sagA*⁺ штаммы *H. pylori*, чем у пациентов с хроническим гастритом ($p<0,001$). Полученный нами результат сопоставим с результатами аналогичных исследований других авторов [3, 17, 21, 23] и свидетельствует о более патогенном потенциале *sagA*⁺ штаммов *H. pylori*.

При дальнейшем анализе в зависимости от возраста пациентов была выявлена более высокая частота встречаемости *sagA*⁺ штаммов *H. pylori* среди взрослых (18-70 лет) – 92,4% по сравнению с детьми (3-17 лет) – 53,7% ($p<0,001$) (рис. 2, в). Полученный нами результат согласуется с ранее опубликованной работой, выполненной в Тунисе на выборке пациентов с гастро-

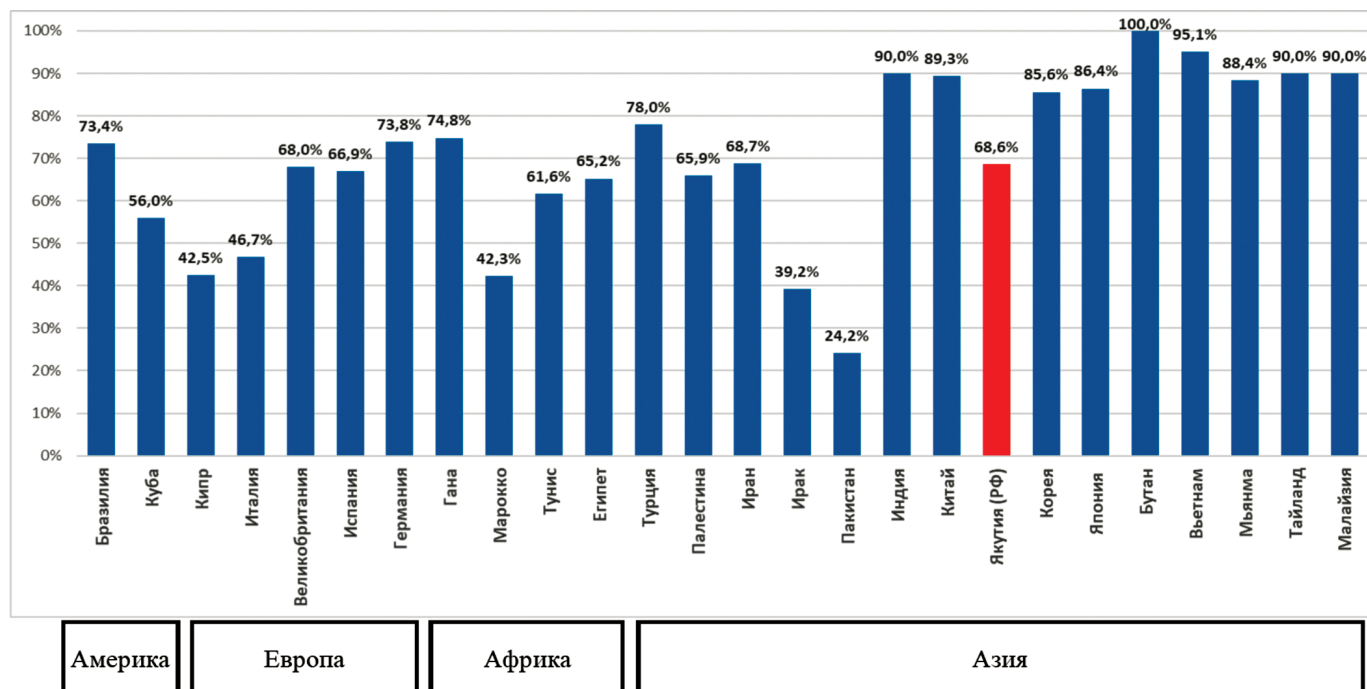


Рис.3. Распространенность *sagA*-положительных штаммов *H. pylori* в разных странах мира

дуоденальными заболеваниями, где было найдено статистически значимое различие между детьми и взрослыми по отношению к гену *sagA* [22]. Так, у взрослых *sagA*⁺ штаммы *H. pylori* были идентифицированы в 155 случаях, а у детей только в 18 [22]. Известно, что иммунитет детей имеет ряд особенностей, делающих их более уязвимыми по отношению к большинству инфекций [1]. Вероятно, что в группе детей *sagA*⁻ штаммы могут приводить к хроническому гастриту так же, как и *sagA*⁺ штаммы, так как в группе детей указанные штаммы встречались практически с одинаковой частотой (рис. 2, б). Возможно, полученный результат указывает на несовершенство иммунной системы у детей, которая является более подверженной многим инфекциям, даже имеющим небольшой патогенный потенциал [1].

Поскольку пол и место рождения/проживания не показали статистически достоверных отличий ($p > 0,05$), нами было выполнено перекрестное сравнение *sagA*⁺ и *sagA*⁻ штаммов с клиническим течением внутри группы детей и взрослых (табл.2). В выборке детей, у которых был установлен хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями, достоверно чаще встречались *sagA*⁺ штаммы (73,7%), чем у детей с хроническим гастритом (43,3%) ($p < 0,001$). В выборке взрослых данная тенденция не подтвердилась, т.к. *sagA*⁺ штаммы преобладали над *sagA*⁻, как в группе пациентов с диагнозом хронический гастрит (91,6% и 8,4%), так и в группе пациентов с диагнозом хронический гастрит с эрозивно-язвенными поражениями (90,7% и 9,3%). Возможно, это объясняется эффектом выборки.

Выводы

1) Нами была показана связь между *sagA*⁺ штаммами *H. pylori* и более тяжелым клиническим течением (эрозивно-язвенные поражения) гастроуденальных заболеваний у пациентов в Якутии. Полученный результат подтверждает ранее известные данные о том, что *sagA*⁺ штаммы являются более вирулентными и патогенными, чем *sagA*⁻ штаммы *H. pylori*.

2) Показано, что *sagA*⁻ штаммы чаще встречались у детей (от 3 до 17 лет), чем у взрослых (18-70 лет). Возможно, это объясняется тем, что у детей иммунная система развита не столь совершенно, как у взрослых, что в свою очередь объясняет большую восприимчивость детей по отношению ко многим инфекциям, даже не столь вирулентным и патогенным.

Работа выполнена при финансовой

поддержке НИР ЯНЦ КМП «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии популяций Республики Саха (Якутия)», госзадания Минобрнауки РФ №6.1766.2017. ПЧ, проекта СВФУ им. М.К. Аммосова «Генетические особенности населения Якутии: структура генофонда, адаптация к холоду, психогенетические характеристики, распространенность некоторых наследственных и инфекционных заболеваний», программы биоресурсных коллекций ФАНО России УНУ «Геном Якутии» ЯНЦ КМП (БРК: 0556-2017-0003), при поддержке РФФИ (№18-54-16004_НЦНИЛ_а, №18-05-60035_Арктика), а также при финансовой поддержке НОФМУ в рамках проекта №:17-2-009477 «Научно-Образовательный фонд как инструмент молодых ученых для повышения профессиональной компетенции и популяризации науки», 20171201015-2».

Литература

- Новиков Д.К. Клиническая иммунология: учебное пособие / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. ВГМУ, 2006. – С. 392.
- Novikov D.K. Clinical immunology: tutorial / D.K. Novikov, P.D. Novikov. VSMU, 2006. – P. 392.
- Association of *cagA* and *vacA* Genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia / H. Andreson, K. Lõivukene, T. Sillakivi [et al.] // J Clin Microbiol. – 2002. – 40. – P. 298-300.
- Association of *Helicobacter pylori cagA* Gene with Gastric Cancer and Peptic Ulcer in Saudi Patients / T. Saber, M.M. Ghonaim, A.R. Yousef [et al.] // J Microbiol Biotechnol. – 2015 Jul – 5(7) – P.146-53.
- Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host / A. García, M.J. Salas-Jara, C. Herrera [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – WJG. – 20(19). – P.5632-5638.
- Blaser M.J. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach / Blaser M.J. // J Clin Invest. – 1997. – 100. – P. 759-762.
- Clinical relevance of *H. pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms / D. Basso, C.F. Zambon, D.P. Letley [et al.] // Gastroenterology. – 2008. – 135. – P. 91-99.
- Clinical Relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* Status of *H. pylori* / L.J. van Doorn, C. Figueiredo, R. Sanna [et al.] // Gastroenterology. – 1998. – 115(15). – P. 58-66.
- Clinical relevance of the *H. pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin / M. Gerhard, N. Lehn, N. Neumayer [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – 96. – P. 12778-12783.
- Effective Methods of Nucleic Acids extraction for Analysis in Molecular Biology (review) / O.S. Antonova, N.A. Korneva, Yu. V. Belov [et al.] // Scientific Instrument Making. – 2010. – Т. – 20. – № 1. – P. 3-9.
- Functional analysis of *iceA1*, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *H. pylori* / Q. Xu, R. D. Morgan, R. J. Roberts [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2002. – 30(17). – P.3839-3847.
- Helicobacter pylori* genotypes among patients in a university hospital in Egypt: identifying

the determinant of disease severity / F.A. Amer, R.H. El-Sokkary, M. Elahmady [et al.] // J. Microbiol. Infect. – 2013. – Dis. – 3. – P. 109-115.

12. *Helicobacter pylori* genotypes and expression of gastritis in erosive gastro-oesophageal reflux disease / A. Leodolter, K. Wolle, U. Peitz [et al.] // Scand J Gastroenterol. – 2003. – 38: 498-502.

13. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains / C. Figueiredo, L.J. van Doorn, C. Nogueira [et al.] // Scand J Gastroenterol. – 2001 Feb. – 36(2). – P. 128-135.

14. *Helicobacter pylori iceA*, clinical outcomes, and correlation with *cagA*: a meta-analysis / S. Shiota, M. Watada, M. Osamu [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – 7(1):e30354.

15. *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study / H. Enroth, W. Kraaz, L. Engstrand [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2000 Sep. – 9(9). – P. 981-985.

16. *Helicobacter pylori vacA*, *iceA* and *cagA* status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease / S. Miehlke, M. Schuppler, C. Frings [et al.] // Am J Gastroenterol. – 2001. – 96. – P. 1008-1013.

17. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production / Y. Yamaoka, S. Kikuchi, H.M. el-Zimaity [et al.] // Gastroenterology. – 2002 Aug. – 123(2). – P. 414-24.

18. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach / M.J. Blaser, G.I. Perez-Perez, H. Kleanthous [et al.] // Cancer Res. – 1995. – May 15. – 55(10). – P. 2111-5.

19. Jenks P.J. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island / P.J. Jenks, F. Megraud, A. Labigne // Gut. – 1998. – 43. – P. 752-758.

20. Kusters J.G. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection / J.G. Kusters, A.H.M. van Vliet, E.J. Kuipers // Clinical Microbiology Reviews. – 2006. – 19(3). – P. 449-490.

21. Momenah A.M. *H. pylori cagA* and *iceA* genotypes status and risk of peptic ulcer in Saudi patients / A.M. Momenah, M.T. Tayeb // Saudi Med J. – 2007. – 28. – P. 382-385.

22. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes in Tunisian patients / K.B. Mansour, C. Fendri, M. Zribi [et al.] // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2010. – 9. – P. 10-16.

23. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection / J. Parsonnet, G.D. Friedman, N. Orentreich [et al.] // Gut. – 1997. – 40(3). – P. 297-301.

24. Rothenbacher D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer / D. Rothenbacher, H. Brenner // Gastroenterology. – 2004. – Vol.126. – Issue 7. – P.1927.

25. Suerbaum S. H. *pylori* infection / S. Suerbaum, P. Michetti. // N Engl. J. Med. – 2002. – 347. – P. 1175-1186.

26. The EPIYA-ABCC motif pattern in *CagA* of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population / F.O. Beltrán-Anaya, T.M. Poblete, A. Román-Román [et al.] // BMC Gastroenterology. – 2014. – 14:223.

27. Tummuru M.K. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production / M.K. Tummuru, T.L. Cover, M.J. Blaser // Infect Immun. – 1993 May. – 61(5). – P. 1799-809.

28. Wroblewski L.E. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk / L.E. Wroblewski, R.M. Peek, K.T. Wilson // Clinical Microbiology Reviews. – 2010. – 23(4). – P. 713-739.