

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕРІУА МОТИВОВ CAG A ГЕНА HELICOBACTER PYLORI  
ПАЦИЕНТОВ С ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА

Воропаева А. В.<sup>1</sup>, Карпенко О. В.<sup>1</sup>, Бредихина Е. В.<sup>1</sup>,  
Борсук А. Д.<sup>2</sup>, Кривун Т. П.<sup>1</sup>, Голубых Н. М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр  
радиационной медицины и экологии человека»  
<sup>2</sup>Учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет»  
г. Гомель, Республика Беларусь

**Введение**

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) представляет собой спиралеобразную грамотрицательную бактерию, которая играет важную роль в патогенезе хронического гастрита, гастродуоденальной язвы и рака желудка. Разнообразные клинические исходы инфицирования зависят от таких факторов, как бактериальная вирулентность, восприимчивость макроорганизма, факторы окружающей среды [1].

Цитотоксинассоциированный ген *cag A* (cytotoxin associated gene) является важным фактором вирулентности *H. pylori*, содержится в 65,5 % штаммов, выделенных у пациентов с гастродуоденальными заболеваниями в Республике Беларусь и связан с развитием пептической язвы и рака желудка [2, 3]. Белок *CagA* кодируется геном *cagA*, который расположен на CAG островке патогенности (CAG-PAI). После адгезии *CagA*-позитивных штаммов *H. pylori* в эпителий желудка, белок *CagA* впрыскивается непосредственно в клетку-хозяина с помощью системы секреции IV типа. Внутри эпителиальной клетки *CagA* фосфорилируется в вариабельной карбокси — концевой области содержащей полиморфную структуру повторов *Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala* аминокислот (ЕРІУА мотив) [4]. Описано четыре типа ЕРІУА мотивов (ЕРІУА-, -В, -С и -D). *CagA* белки всегда имеют ЕРІУА-А и ЕРІУА-В мотивы, но в некоторых белках содержится один или более повторов ЕРІУА-С. Такая модель характерна для штаммов, циркулирующих в западных странах, таких как Европа, Северная Америка и Австралия (западный *CagA*), в то время как наличие мотивов ЕРІУА-А и ЕРІУА-В, а затем ЕРІУА-D для штаммов *H. pylori* азиатских стран.

ЕРІУА-С и -D мотивы являются основными сайтами для фосфорилирования *CagA*. Фосфорилированный *CagA* образует физический комплекс с SHP-2 фосфатазой и запускает патологические клеточные сигналы, которые приводят к дерегуляции клеточного роста, миграции клеток, относительно удлинению и увеличению числа эпителиальных клеток, что повышает риск развития предраковых генетических изменений [5].

**Цель**

Определить *CagA* фосфорилированные мотивы (ЕРІУА) и изучить их связь с патологией желудка.

**Материал и методы исследования**

В исследовании принимали участие пациенты с диагнозом хронический гастрит (ХГ) и рак желудка (РЖ). Группа ХГ состояла из 200 пациентов (средний возраст  $51,51 \pm 15,72$ ), из них 76 мужчин (средний возраст  $51,52 \pm 15,87$ ) и 124 женщины (средний возраст  $51,5 \pm 15,69$ ). Группа РЖ состояла из 69 человек (средний возраст  $65,59 \pm 10,98$ ), из них 39 мужчин (средний возраст  $66,36 \pm 11,27$ ) и 30 женщин (средний возраст  $64,6 \pm 10,72$ ).

Материалом для исследования являлись биоптаты слизистой оболочки желудка (СОЖ), забранные во время фиброгастродуоденоскопии. С каждым из обследуемых пациентов заключалось информированное согласие на участие в исследовании. Для выделения геномной ДНК применяли сорбционный метод на колонках с использованием протеиназы К (Invitrogen, США). Очищенную ДНК хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до использования.

ПЦР-амплификацию проводили в 25 мкл на основе реакционной смеси Dream Tag Green PCR Master Mix (2x), прямого и обратного праймеров С97-20 и Н3А-20 для выявления 16S-rPHK гена *H.pylori* (F5'-GGCTATGACGGGTATCCGGC-3', R5'-GCCGTGCAGCACCTGTTTTTC-3') и 1 мг геномной ДНК со следующим температурным режимом:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 3 мин — 1 цикл;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 30 с,  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 1 мин,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  — 1 мин — 35 циклов, и  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин 1 цикл. Далее проводили электрофорез в 1,7 % агарозном геле.

В качестве контроля использовали маркер молекулярного веса (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder) производства компании (Thermo Fisher Scientific). В пробе с отрицательным контролем свечение не обнаруживалось.

Для выявления *cagA* гена *H. pylori* использовали праймеры с установленной нами ранее максимальной чувствительностью и праймеры для выявления западного и восточного типов цитотоксина-социируемого гена и EPIYA-мотивов. Определение EPIYA-C мотивов проводили с использованием праймеров *cagA2/cagA West* и количества EPIYA-C мотивов с использованием праймеров *cagA2530S / cagA3000AS*. Наличие двойной полосы при электрофорезе может соответствовать сочетанной инфекции или микроэволюции одного штамма у данного пациента.

Каждой паре праймеров соответствовали оптимальные температура отжига и продолжительность элонгации, представленные в таблице 1.

Таблица 1 — Праймеры и температура отжига, используемые для выявления *cagA* гена *H. pylori* и EPIYA-мотивов

Название праймеров	Последовательность праймеров 5'-3'	Режим амплификации	Размер фрагмента
<i>cagA F1-cag AB1</i>	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGGGA CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	95 °C — 3 мин — 1 цикл 95 °C — 30 с 55 °C — 60 с — 35 циклов 72 °C — 60 с 72 °C — 60 с — 1 цикл	349 п.н.
<i>cagA2 cagA East</i>	GGAACCCTAGTCGGTAATG TTTCAAAGGGAAAGGTCCGCC	95 °C — 3 мин — 1 цикл 95 °C — 30 с 53 °C — 60 с — 35 циклов 72 °C — 60 с 72 °C — 60 с — 1 цикл	397 п.н.
<i>cagA2 cagA West</i>	GGAACCCTAGTCGGTAATG AGAGGGAAGCCTGCTTGATT	95 °C — 3 мин — 1 цикл 95 °C — 30 с 62 °C — 45 с — 35 циклов 72 °C — 45 с 72 °C — 60 с — 1 цикл	399 п.н.
<i>cagA2530S cagA3000AS</i>	GTTAACAATRGTTGTRAATGG TTTAGCTTCTGATACCGC	95 °C — 3 мин — 1 цикл 95 °C — 30 с 55 °C — 60 с — 35 циклов 72 °C — 60 с 72 °C — 60 с — 1 цикл	370–670 п.н. (± 25 п.н.)

### Результаты исследования и их обсуждение

Специфическая фракция размером 765 п.н., характеризующая присутствие ДНК *H. pylori* в анализируемой пробе выявлена в 65 (32,5 %) из 200 исследуемых препаратов ДНК пациентов с диагнозом ХГ и в 45 (65,2 %) пациентов с диагнозом РЖ. *CagA* положительные образцы в группе пациентов: с диагнозом ХГ составили 50,7 %, РЖ — 64,4 %. Фрагмент *cagA*-гена, характеризующий восточный тип *H. pylori* (использование пары праймеров с зоной амплификации 495 п.н. — *cag2 / cagA East*) не был выявлен ни в одном из исследуемых образцов.

В группе пациентов с ХГ EPIYA ABC мотивы выявлены в 81,8 % (27 из 33), EPIYA ABCC в 12,1 % (4 из 33), и в 2-х образцах (6,1 %) EPIYA — мотивы не определены.

В группе пациентов с РЖ EPIYA ABC мотивы выявлены в 58,6 % (17 из 29), EPIYA ABCC в 20,7 % (6 из 29) и EPIYA ABCCC в 13,8 % (4 из 29) и 6,9 % (2 из 29) образцы смешаного типа — EPIYA ABC и EPIYA ABCC.

### Заключение

Установлено, что среди циркулирующих в Республике Беларусь *CagA* положительных штаммов большинство составляют штаммы, имеющие один EPIYA-C мотив — 81,8 % при ХГ и 58,6 % при РЖ. Увеличение EPIYA-C мотивов коррелирует с более высокой активностью воспаления согласно данных гистологического анализа (коэффициент корреляции 0,85). EPIYA-C мотивы с несколькими повторами С-сегмента определены только при РЖ. Определение EPIYA мотивов может являться прогностическим фактором риска развития заболеваний желудка и характеризует канцерогенный потенциал циркулирующих в регионе штаммов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection / J. G. Kusters [et al.] // Clin Microbiol Rev. — 2006. — Vol. 19, № 3. — P. 449–490.
2. Воропаева, А. В. Изучение распространенности патогенных штаммов *H. pylori* в Республике Беларусь / А. В. Воропаева, С. В. Жаворонок // Иммунология, аллергология, инфектология. — 2011. — № 1. — С. 64–70.
3. Hatakeyama, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein / M. Hatakeyama // Nat Rev Cancer. — 2004. — Vol. 4, № 9. — P. 688–694.
4. A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori* / Y. Xia [et al.] // PLoS One. — 2009. — Vol. 4. — P. 7736
5. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori* / R. Argent [et al.] // Gastroenterology. — 2004. — Vol. 12. — P. 514–523.