

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.98:616.33-006.6]:579.835

АНАЛИЗ КАНЦЕРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА *HELICOBACTER PYLORI* НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ CagA-БЕЛКА БАКТЕРИИ

Е. В. Воропаев¹, О. В. Осипкина¹, О. Ю. Баранов¹, А. А. Зятков¹,
Н. А. Бонда², Э. Н. Платошкин¹, А. В. Воропаева¹, В. Н. Беляковский¹,
С. Л. Ачинович³, А. С. Шафорост¹, В. И. Зайцева⁴

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

²Государственное учреждение

«Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

г. Гомель, Республика Беларусь

³Учреждение здравоохранения

«Гомельский областной клинический онкологический диспансер»

г. Гомель, Республика Беларусь

⁴Учреждение здравоохранения

«Гомельская городская клиническая больница № 2»

г. Гомель, Республика Беларусь

Представлен разработанный молекулярно-генетический метод анализа канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori*, основанный на определении степени фосфорилирования цитотоксин-ассоциированного белка бактерии (CagA). Степень фосфорилирования CagA-белка *Helicobacter pylori* оценивается по определению количества и вида так называемых EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)-мотивов в карбоксильном конце участка CagA-белка, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования локуса CagA-гена. Предложенный метод может применяться для формирования групп пациентов, нуждающихся в дополнительном обследовании и диспансерном наблюдении с целью раннего прогнозирования патологических состояний, связанных с инфекционным процессом, вызванным доминирующими в Республике Беларусь штаммами *Helicobacter pylori*. Определение количества и типа EPIYA-мотивов может использоваться в качестве дополнительного критерия для определения групп риска по заболеваниям желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, ДНК, ПЦР, секвенирование, фосфорилирование белка, канцерогенный потенциал, EPIYA-мотивы, лабораторная диагностика.

The developed molecular and genetic method for analysis of the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori* based on determining the degree of phosphorylation of the cytotoxin-associated protein of the bacterium (CagA) has been presented. The degree of phosphorylation of CagA protein of *Helicobacter pylori* is estimated by determining the number and type of so-called EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) motifs at the carboxyl end of the CagA protein region using PCR (polymerase chain reaction) and sequencing of the CagA gene locus. The proposed method can be used to form groups of patients who need additional examination and follow-up observation for the purpose of early prediction of pathological conditions associated with the infectious process caused by *Helicobacter pylori* strains dominating in the Republic of Belarus. The determination of the number and type of EPIYA motifs can be used as an additional criterion for detection of risk groups for gastrointestinal diseases.

Key words: *Helicobacter pylori*, DNA, PCR, sequencing, protein phosphorylation, carcinogenic potential, EPIYA-motifs, laboratory diagnostics.

Problemy zdorov'ya i ekologii. 2018 Oct-Dec; Vol 58 (4): 86-93

Analysis of the Carcinogenic Potential of *Helicobacter Pylori* Based on Determination of the Degree of Phosphorylation of the Caga Protein Bacteria

E.V. Voropaev, O.V. Osipkina, O.Yu. Baranov, A.A. Zyatkov, N.A. Bonda, E.N. Platoshkin, A.V. Voropaeva, V.N. Belyakovsky, S.L. Achinovich, A.S. Shaforost, V.I. Zaitseva

Введение

К инфекционным агентам, обладающим канцерогенным потенциалом, относится патогенная грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori* — единственная бактерия, классифици-

рованная ВОЗ как канцероген I типа [1]. *Helicobacter pylori* — мелкая грамотрицательная бактерия изогнутой или слегка спиралевидной формы, колонизирующая слизистую оболочку желудка человека и вызывающая

хронический воспалительный процесс. Она избирательно колонизирует эпителий желудка и является этиологическим агентом MALT-лимфомы, язвы желудка, двенадцатиперстной кишки и рака желудка [2]. Распространенность *Helicobacter pylori* — инфекции в различных регионах мира существенно отличается и зависит от социально-экономических условий. Средний уровень распространенности *Helicobacter pylori* в мире составляет около 60 %. Наибольшая распространённость *Helicobacter pylori* отмечена в развивающихся странах, где может быть инфицировано до 80 % взрослого населения [3]. В настоящее время данный микроорганизм считается наиболее распространенным этиологическим инфекционным канцерогенным агентом и является по сути ответственным за 5,5 % глобального бремени рака, что делает изучение его канцерогенных аспектов весьма актуальной задачей [4]. Значительная часть инфицированных пожизненно является бессимптомными носителями, но при этом у большинства может развиваться хроническое воспаление [5]. Среди инфицированных приблизительно в 10 % случаев возникает язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки, у 1–3 % процесс может прогрессировать до рака желудка (в основном представленного аденокарциномой), а у очень небольшого количества пациентов — примерно у 0,1 % инфекционный процесс может закончиться развитием MALT-лимфомы [6]. Из различных заболеваний, этиологической причиной которых является *Helicobacter pylori*, злокачественные новообразования ЖКТ являются самыми важными объектами для изучения, требующие широкомасштабных популяционных исследований. Понимание молекулярно-генетического механизма канцерогенеза, индуцированного *Helicobacter pylori*, имеет очень важное значение для разработки новых стратегий борьбы с возникновением рака желудка. Частота рака желудка, причиной которого непосредственно является *Helicobacter pylori*, различается в различных популяциях, наибольшее количество (75 %) таких раков отмечают в Японии, а наименьшее (около 10 %) — в Европейских популяциях [7]. Следует отметить, что в настоящее время выявление рака желудка в 80 % случаев происходит на IV стадии, когда вероятность успешного лечения крайне мала, что делает разработку системы ранней диагностики рака желудка хеликобактерной этиологии очень важной.

В соседних с Беларусью странах инфицированность среди взрослых находится на уровне 70,3 % и составляет от 5,4 до 65,4 % среди детей до 18 лет в Польше. В России (Нижний Новгород, Владивосток) уровень инфицированности взрослых составляет 82,9 % и

58,9 % — детей, в то время как уровень инфицированности детей в Санкт-Петербурге — 75,7 % [8]. Инфицированность *Helicobacter pylori* составляет 74,6 % у взрослых и 66,7 % у детей, по данным других белорусских исследователей при наличии гастроэнтерологической симптоматики инфицированность составляет от 60 до 94 % [9], а при дуоденальной язве близка к абсолютной, тогда как у детей до 18 лет находится в пределах 52 % [10].

Патогенетические механизмы *Helicobacter pylori* реализуются посредством факторов вирулентности и патогенности, одним из которых является белок CagA. CagA-белок *Helicobacter pylori* и систему секреции IV типа Cag (T4SS) кодируют несколько генов, расположенных на островке патогенности (cagPAI) [11], одним из которых является CagA. CagA-ген (цитотоксин-ассоциированный ген A) — иммунодоминантный антиген *Helicobacter pylori*, имеющий наибольшее значение в патогенезе заболеваний, связанных с данной бактерией [11]. Патогенетический потенциал CagA-гена реализуется системой T4SS, вводящей его в клетки хозяина и тем самым стимулируя канцерогенный ангиогенез [12]. После переноса в цитоплазму клетки-хозяина, CagA может связываться с внутренней поверхностью клеточной мембраны и подвергаться фосфорилированию тирозинкиназами семейства Src на EPIYA-мотивах (глутамат-пролин-изолейцин-тирозин-аланин). Эти мотивы определяются как EPIYA-A, -B, -C и -D в соответствии с аминокислотной последовательностью, окружающей последовательность EPIYA [13]. Фосфорилированный таким образом CagA-белок индуцирует изменения сигнальной клетки-хозяина, повышающие пролиферативную способность клеток желудочного эпителия, что приводит к резкому удлинению клеток, называемому «фенотипом колибри», и напрямую зависит от количества мотивов EPIYA в вариабельной области [13]. Исходя из вышеизложенного, увеличение количества EPIYA-мотивов может служить оценкой степени канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori* и прогностическим фактором развития рака желудка [14]. Ранее проведенные исследования показали, что западные типы CagA-белка почти всегда содержат EPIYA -A, -B и -C-мотивы (может присутствовать до 5 EPIYA-C-мотивов), а восточно-азиатские типы — EPIYA -A, -B, и -D. Увеличение числа EPIYA-C-мотивов повышает риск развития рака желудка в западных штаммах *Helicobacter pylori* [15], а EPIYA-D — в восточных [16].

В основе апробированного метода лежит молекулярно-генетическая оценка степени фосфорилирования CagA-белка *Helicobacter pylori*, ответственного за патогенный потенциал бак-

терии с помощью определения EPIYA-мотивов, различающихся по количеству и виду A, B, C или D-повторов в карбоксильном конце.

Штаммы, имеющие одновременно EPIYA-A и B-мотивы или содержащие один EPIYA-C-мотив, обуславливают более чем семикратное увеличение риска развития рака желудка по сравнению с CagA-негативными штаммами [15]. Штаммы, содержащие два или более EPIYA-C-мотивов, обуславливают более чем 30-кратное повышение риска [17]. Большое число EPIYA-C или D-мотивов ассоциируется с увеличением риска кишечной метаплазии, предзлокачественных изменений [18].

Цель работы

Оценить канцерогенный потенциал *Helicobacter pylori* по степени фосфорилирования CagA-белка бактерии, используя анализ полиморфных белковых мотивов EPIYA.

Материалы и методы

В исследовании был использован биологический банк образцов, хранящихся в научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», обследованы пациенты учреждений здравоохранения «Гомельская городская клиническая больница № 2» и «Гомельский областной клинический онкологический диспансер». Всем пациентам была выполнена гастроскопия с забором биопсийного материала желудка. Общая выборка включала 135 образцов биоптатов слизистой оболочки желудка пациентов с патологией ЖКТ.

Методами исследования являлись: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с электрофоретической детекцией, секвенирование ДНК по Сэнжеру с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM 310 (Thermo Fisher Scientific, США), которые выполнялись на базе научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет». Геномное секвенирование проводилось с использованием генетического анализатора нового поколения ION TORRENT (Thermo Fisher Scientific, США) на базе лаборатории института леса НАН Беларуси. Для проведения исследований использованы ком-

мерческие реагенты и расходные материалы согласно инструкциям производителей. Для оценки полученных результатов использованы программное обеспечение: Sequencing Analysis software version 5.1.1. (Thermo Fisher Scientific, США), CLC Sequence Viewer version 8.0.0 (QIAGEN Bioinformatics, США), UGENE 1.31.1 (УНИПРО, Новосибирский центр информационных технологий, Россия) и возможности международного генного банка NCBI. Проведен анализ образцов нуклеотидных последовательностей, зарегистрированных в международном генном банке NCBI и находящихся в свободном доступе в сети Интернет <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

В качестве биологического материала использованы биоптаты слизистой оболочки желудка пациентов, взятые во время проведения фиброгастроуденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка. Полученный материал (кусочки ткани объемом не более 5 мм³) вносили в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора. Пробирки с пробами плотно закрывали, маркировали и транспортировали в лабораторию. Культивирование *Helicobacter pylori*, проводили используя коммерческие реагенты фирмы Биомерье (bioMérieux, Франция) на базе государственного учреждения «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Выделение ДНК проводили адсорбционным методом в центрифужных колонках, полностью удаляя ингибиторы ПЦР. Концентрацию и чистоту препаратов ДНК определяли с помощью безкюветного спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Выявление ДНК *Helicobacter pylori* в образцах биоптатов слизистой оболочки желудка (антральный отдел и тело) проводили методом ПЦР, используя праймеры для амплификации фрагмента гена 16S рНК *Helicobacter pylori*. Праймеры синтезированы ОДО «Праймтех» (Беларусь). Структура праймеров для проведения ПЦР приведена в таблице 1.

Таблица 1 — Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления ДНК *Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
16S-HP-прямой	GGCTATGACGGGTATCCGGC
16S-HP-обратный	GCCGTGCAGCACCTGTTTC

Программа амплификации: денатурация 1 цикл — 95 °С, 3 мин; 35 циклов (95 °С — 30 с, 63 °С — 60 с, 72 °С — 60 с); финальная элонгация 1 цикл — 72 °С, 2 мин.

В результате ПЦР в образцах был амплифицирован специфический фрагмент размером 763 п.н. гена 16S рНК *Helicobacter pylori*. В качестве положительного контроля (к+) ис-

пользовали имеющиеся в лаборатории стандарты ДНК *Helicobacter pylori*. Соответствие амплифицированных зон фрагменту гена 16S рРНК *Helicobacter pylori* проводили методом секвенирования ДНК по Сэнжеру.

Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori* приведена в таблице 2.

Программа амплификации: денатурация 1 цикл — 95 °С, 3 мин; 42 цикла (95 °С — 20 с, 55 °С — 20 с, 72 °С — 20 с); финальная элонгация 1 цикл — 72 °С, 2 мин.

В результате ПЦР в образцах амплифицируется специфический фрагмент размером 349 п.н. гена *CagA Helicobacter pylori*. Соответствие амплифицированных зон фрагменту гена *CagA Helicobacter pylori* проводили методом секвенирования.

При выявлении *CagA*-гена *Helicobacter pylori* определяли ЕРІУА-содержащие зоны методом ПЦР, структура праймеров для проведения ПЦР приведена в таблице 3.

Учитывая важность выявления количества ЕРІУА-С-повторов на основании генетических последовательностей *CagA*-положительных

образцов, последовательность обратного ЕРІУА-праймера AGC(A/G)TAAATGGGTTTC была разработана нами специально и затем проведено тестирование.

Программа амплификации: денатурация 1 цикл — 95 °С, 3 мин; 42 цикла (95 °С — 30 с, 38 °С — 45 с, 72 °С — 45 с); финальная элонгация 1 цикл — 72 °С, 2 мин.

Классификация ЕРІУА-мотивов приведена в таблице 4.

Результаты и обсуждение

При проведении исследований с помощью ПЦР, у 79 пациентов из 135 (58,5 % случаев) была выявлена ДНК *Helicobacter pylori*. Положительный *CagA*-статус, также определенный методом ПЦР, отмечен в 66 образцах (83,5 %). Затем для выявления количества и видов ЕРІУА-мотивов *CagA* в этих образцах проводили ПЦР с дальнейшим анализом фореграмм и верификацией методом секвенирования ДНК по Сэнжеру.

Результат электрофоретической детекции амплифицированных ЕРІУА-содержащих фрагментов *CagA*-белка *Helicobacter pylori* в качестве примера представлен на рисунке 1.

Таблица 2 — Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
<i>CagA</i> -прямой	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGGGA	349 пар нуклеотидов (п.н.)
<i>CagA</i> -обратный	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	

Таблица 3 — Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления ЕРІУА-мотивов гена *CagA Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
ЕРІУА-прямой	GGAACCCTAGTCGGTAATG	147 – 567 п.н.
ЕРІУА-обратный	AGC(A/G)TAAATGGGTTTC	

Таблица 4 — Классификация ЕРІУА-мотивов [18]

Аминокислотная последовательность	Вид ЕРІУА-мотивов
ЕРІУА KVNKKK(A/T/V/S)GQ;	ЕРІУА-А
E(S/P)IY(A/T) (Q/K)VAKKVNAKI;	ЕРІУА-В
ЕРІУА TIDDLG	ЕРІУА-С
ЕРІУА TIDFDEANQAG.	ЕРІУА-Д

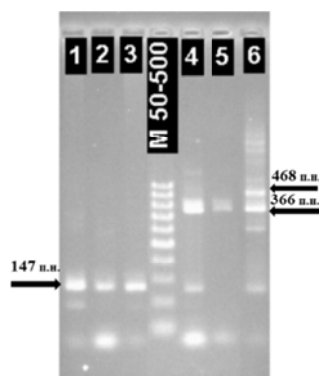


Рисунок 1 — Электрофоретическая детекция с целью выявления количества и видов ЕРІУА-мотивов *CagA*-белка *Helicobacter pylori*

Как видно на рисунке 1, образцы № 1, 2, 3 визуализируются как зона размером 147 п.н., соответственно содержат EPIYA-мотивы АВ. Образец № 4 визуализируется в виде двух зон 147 п.н. и 366 п.н., образец № 5 — в виде зоны 366 п.н., что соответствует наличию 3 EPIYA-мотивов АВС. Образец № 6 представлен тремя зонами 147 п.н., 366 п.н., 468 п.н, что соответствует 4 EPIYA-мотивам АВСС.

Полученная нуклеотидная последовательность затем была транслирована в аминокислотную с помощью программы CLC Sequence Viewer version 8.0. (рисунок 2).

Как видно на рисунке 2, при амплификации зоны длиной 468 п.н. в аминокислотной по-

следовательности обнаружены 4 EPIYA-мотива: EPIYAKVN, EPIYAQVAK, EPIYATIDDL, EPIYA, которые согласно общепринятой классификации оцениваются как виды А, В, С, а также четвертый неизвестный вид EPIYA.

Для уточнения вида EPIYA и, соответственно, для увеличения зоны фрагмента гена CagA были использованы возможности геномного секвенирования, фрагмент данных которого представлен на рисунке 3.

Как видно на рисунке 3, четвертый EPIYA-мотив является видом С. Таким образом, в исследуемом образце выявлено 4 EPIYA-мотива: EPIYAKVN, EPIYAQVAK, EPIYATIDDL, EPIYATIDDL — АВСС.

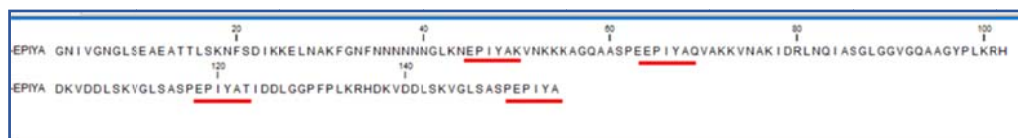


Рисунок 2 — Аминокислотная последовательность фрагмента белка CagA *Helicobacter pylori* одного из исследуемых образцов

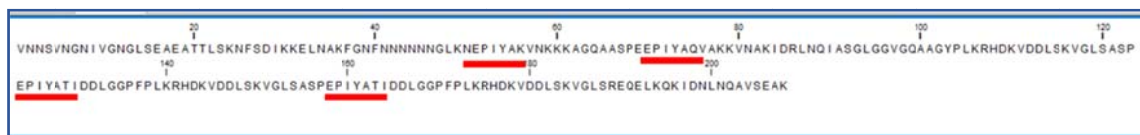


Рисунок 3 — Фрагмент аминокислотной последовательности белка CagA *Helicobacter pylori* одного из исследуемых образцов (получен с использованием геномного секвенирования)

Виртуальный анализ степени комплементарности праймеров к ДНК-мишени представлен на рисунке 4. В качестве ДНК-мишени использован фрагмент нуклеотидной последова-

тельности, полученной при секвенировании ДНК культуры *Helicobacter pylori*, культивируемой из образца пациента с диагнозом: «Хронический атрофический гастрит».

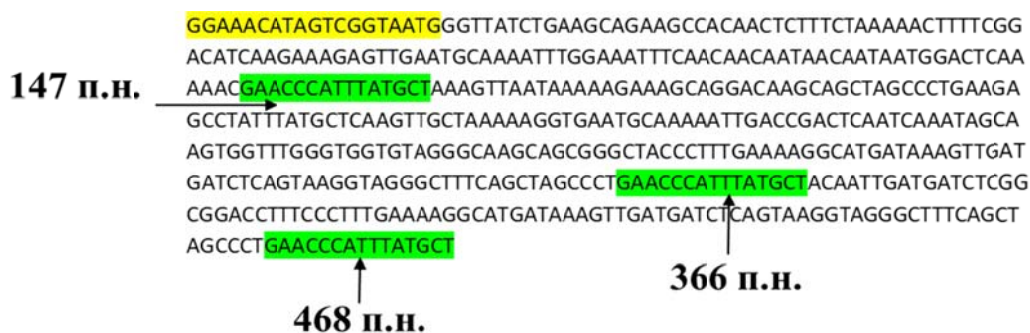


Рисунок 4 — Виртуальный анализ степени комплементарности праймеров к ДНК-мишени (фрагмент нуклеотидной последовательности, полученной при секвенировании ДНК культуры *Helicobacter pylori*)

Как видно на рисунке 4, в результате виртуальной ПЦР образуются ампликоны размером 147-366-468 п.н., что соответствует данным реальной ПЦР, представленным на электрофореграмме (рисунок 1, образец № 6).

Кроме реальных образцов, полученных от белорусских пациентов, нами был проведен анализ эталонных виртуальных образцов из

международного генного банка NCBI. С использованием электронного ресурса NCBI осуществлен сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей эталонных образцов *Helicobacter pylori*, зарегистрированных в международном генном банке. Результаты анализа эталонных образцов из генного банка представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Количество и виды EPIYA-мотивов CagA-белка *Helicobacter pylori* эталонных образцов из генного банка

№ образца NCBI	Количество EPIYA	Аминокислотная последовательность	Виды EPIYA	Зоны на фореграмме
AB015416.1	2	EPIYAKVNKKKAGQ EPIYAQVAKKVNKI	AB	147-204
KU516680.1	3	EPIYAEVNKKKTGQ EPIYTQVAKKVKAKI EPIYATIDDLG	ABC	147-204-363
KR154746.1	3	EPIYAKVNKKKTGQ EPIYAQVAKKVSASI EPIYATIDFDEANQAG	ABD	209-374
AF222807.1	4	EPIYAKVNKKKTQGQ EPIYAQVAKKVNKI EPIYASIDDLGGPFPLK EPIYATIDDLGGPFPLK	ABCC	153-213-375-477
AB017921.1	4	EPIYAQVNKKKTGQ EPIYAQVARKVSAKI EPIYAQVARKVSAKI EPIYATIDFDEANQ	ABBC	153-209-375-537
AB003397.1	5	EPIYAKVNKKKTGQ EPIYAQVAKKVNKI EPIYATIDDLG EPIYATIDDLG EPIYATIDDLG	ABCCC	147-363-465-567
AB090102.1	6	EPIYAQVNKKKTGQ EPIYAQVAKKVSASI EPIYATIDFDEANQAG EPIYAQVNKKKTGQ EPIYAQVAKKVSASI EPIYATIDFDEANQAGFP	ABDABD	372-867

В таблице 5 показаны возможные варианты размеров фрагментов, амплифицированных и визуализируемых на фореграмме, и соответствующие им количество и тип EPIYA-мотивов.

На рисунке 5 показан виртуальный анализ степени комплементарности праймеров к ДНК-мишени, в качестве которой использован фрагмент нуклеотидной последовательности CagA-

гена *Helicobacter pylori* образца из международного генного банка NCBI (AB003397.1).

Как видно на рисунке 5, виртуальная ПЦР приводит к образованию 4 ампликонов размером 147-363-465-567 п.н., анализ соответствующей аминокислотной последовательности показал наличие 5 EPIYA-мотивов — ABCCC (таблица 5).

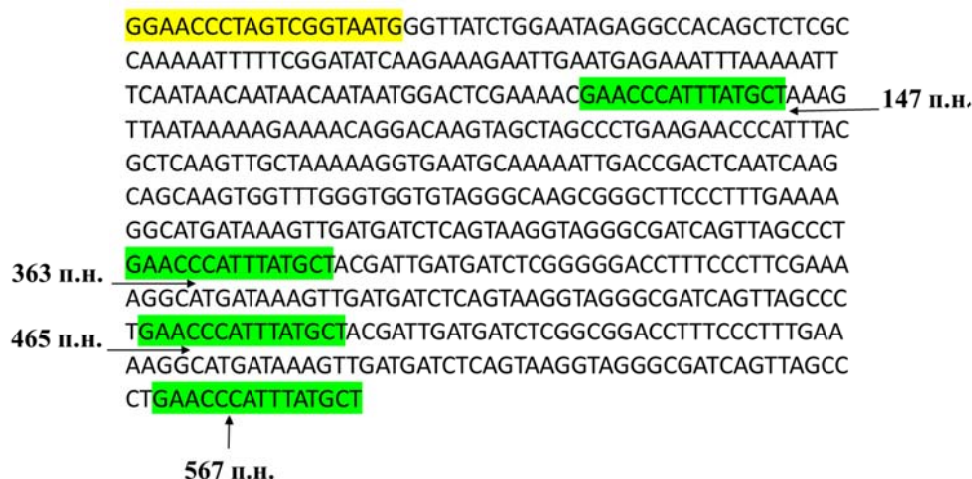


Рисунок 5 — Виртуальный анализ степени комплементарности праймеров к ДНК-мишени (фрагмент нуклеотидной последовательности эталонного образца AB003397.1 из генного банка NCBI)

С помощью секвенирования показано, что увеличение количества EPIYA-мотивов сопровождается увеличением размера амплифицированного фрагмента. Клинический анализ изученных штаммов показал, что имеются образцы, отличающиеся по количеству EPIYA-мотивов, характеризующиеся различными диагнозами. При исследовании биологических образцов, полученных от белорусских пациентов, определено от 2 до 4 EPIYA-мотивов.

С помощью данного метода обследования 2 EPIYA-мотива выявлено в 12 образцах (18 %), из которых 8 образцов получено от пациентов с диагнозом: «Хронический поверхностный гастрит» и 4 образца — с диагнозом: «Язва желудка»; 3 EPIYA-мотива — в 44 образцах (67 %), из которых 24 образца получено от пациентов с диагнозом: «Хронический поверхностный гастрит», 8 образцов — с диагнозом: «Язва желудка» и 12 образцов — с диагнозом «Рак желудка»; 4 EPIYA-мотива — в 10 образцах (15 %), из которых 2 образца от пациентов с диагнозом: «Хронический атрофический гастрит» и 8 образцов — с диагнозом: «Рак желудка».

Выводы

ДНК *Helicobacter pylori* выявлена у 58,5 % пациентов (79 из 135), из которых у 83,5 % выявлен CagA-ген (66 из 79). 2 EPIYA-мотива CagA-белка (AB) выявлялись при хроническом поверхностном гастрите в 25 % случаев (8 из 32), при язве желудка — в 33,3 % случаев (4 из 12); 3 EPIYA-мотива (ABC) выявлялись при хроническом поверхностном гастрите в 75 % случаев (24 пациента из 32), при язве желудка — в 66,7 % случаев (8 пациентов из 12) и при раке желудка — в 60 % случаев (12 из 20); 4 EPIYA-мотива (ABCC) выявлялись только при хроническом атрофическом гастрите у 2 пациентов и при раке желудка — в 40 % случаев (8 из 20). Как видно из представленных данных, в популяции белорусских пациентов встречались только A-, B- и C-мотивы и количество EPIYA-мотивов связано с усилением тяжести течения заболеваний ЖКТ, что в целом согласуется с литературными данными [15].

Таким образом, предложенный диагностический алгоритм позволяет оценить канцерогенный потенциал *Helicobacter pylori* при помощи выявления количества и видов полиморфных EPIYA-мотивов, отражающих степень фосфорилирования CagA-белка, и может использоваться как дополнительный метод для формирования групп пациентов, имеющих повышенный риск развития рака желудка, связанного с *Helicobacter pylori*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):449-90. doi: 10.1128/CMR.00054-05.

2. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):713-39. doi: 10.1128/CMR.00011-10.

3. Wang AY, Peura DA. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2011;21(4):613-35. doi: 10.1016/j.giec.2011.07.011.

4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.

5. Warren JR. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am.* 2000;29(3):705-51.

6. Noto JM, Peek RM. *Helicobacter pylori*: an overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;921:7-10. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_2.

7. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol.* 2012;4(7):156-69. doi: 10.4251/wjgo.v4.i7.156.

8. Климанская ЕВ, Возжаева ФС, Новикова АВ. Клинико-эпидемиологическое наблюдение при хроническом гастродуодените у детей, проживающих в условиях мегаполиса. *Рос Журн Гастроэнтерологии Гепатологии и Колопроктологии.* 1997; VII(5, приложение 4):30.

9. Мараховский КЮ, Мараховский ЮХ. Гастродуоденальная патология, ассоциированная с *Helicobacter pylori*, в детском возрасте. *Рос Журн Гастроэнтерологии Гепатологии и Колопроктологии.* 1997;VII(3):62-3.

10. Жебрун АБ. Инфекция *Helicobacter pylori*-глобальная проблема здравоохранения. *Биосфера.* 2015;7(2):227-37.

11. Müller A. Multistep activation of the *Helicobacter pylori* effector CagA. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1192-5. doi: 10.1172/JCI61578.

12. Boyanova L. Role of *Helicobacter pylori* virulence factors for iron acquisition from gastric epithelial cells of the host and impact on bacterial colonization. *Future Microbiol.* 2011;6(8):843-6. doi: 10.2217/fmb.11.75.

13. Chang C-C, Kuo W-S, Chen Y-C, Perng C-L, Lin H-J, Ou Y-H. Fragmentation of CagA Reduces Hummingbird Phenotype Induction by *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE.* 2016;21(3). [cited 15 Nov 2018] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775065/>.

14. Fischer W, Prassl S, Haas R. Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;337:129-71. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6_5.

15. Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, et al. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol.* 2011 Mar 24;11:61. doi: 10.1186/1471-2180-11-61.

16. Vilar e Silva A, Junior MR da S, Vinagre RMD, Santos KN, da Costa RAA, Fecury AA, et al. Evaluation of the Pattern of EPIYA Motifs in the *Helicobacter pylori* cagA Gene of Patients with Gastritis and Gastric Adenocarcinoma from the Brazilian Amazon Region. *Int J Bacteriol.* 2014;2014:1-6. doi: 10.1155/2014/418063.

17. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007;133(2):659-72. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.026.

18. Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(4):196-219. doi: 10.2183/pjab.93.013.

REFERENCES

1. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):449-90. doi: 10.1128/CMR.00054-05.

2. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):713-39. doi: 10.1128/CMR.00011-10.

3. Wang AY, Peura DA. The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2011;21(4):613-35. doi: 10.1016/j.giec.2011.07.011.

4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.

5. Warren JR. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am.* 2000;29(3):705-51.

6. Noto JM, Peek RM. *Helicobacter pylori*: an overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;921:7-10. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_2.

7. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol.* 2012;4(7):156-69. doi: 10.4251/wjgo.v4.i7.156.
8. Klimanskaya EV, Vozzhaeva FS, Novikova AV. Kliniko-epidemiologicheskoe nablyudenie pri hronicheskom gastroduodenite u detej, prozhivayushchih v usloviyah megapolisa. *Ros Zhurn Gastroenterologii i Koloproktologii.* 1997;VII(5, prilozhenie 4):30. (in Russ.).
9. Marahovskij KYU, Marahovskij YUH. Gastroduodenal'naya patologiya, associirovannaya s Helicobacter pylori, v detskom vozraste. *Ros Zhurn Gastroenterologii i Koloproktologii.* 1997;VII(3):62-3. (in Russ.).
10. ZHebrun AB. Infekciya Helicobacter pylori – global'naya problema zdavoohraneniya. *Biosfera.* 2015;7(2):227-37. (in Russ.).
11. Müller A. Multistep activation of the Helicobacter pylori effector CagA. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1192-5. doi: 10.1172/JCI61578.
12. Boyanova L. Role of Helicobacter pylori virulence factors for iron acquisition from gastric epithelial cells of the host and impact on bacterial colonization. *Future Microbiol.* 2011;6(8):843-6. doi: 10.2217/fmb.11.75.
13. Chang C-C, Kuo W-S, Chen Y-C, Perng C-L, Lin H-J, Ou Y-H. Fragmentation of CagA Reduces Hummingbird Phenotype Induction by Helicobacter pylori. *PLoS ONE.* 2016;21(3). [cited 15 Nov 2018] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775065>.
14. Fischer W, Prassl S, Haas R. Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;337:129-71. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6_5.
15. Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, et al. Higher number of Helicobacter pylori CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol.* 2011 Mar 24;11:61. doi: 10.1186/1471-2180-11-61.
16. Vilar e Silva A, Junior MR da S, Vinagre RMD, Santos KN, da Costa RAA, Fecury AA, et al. Evaluation of the Pattern of EPIYA Motifs in the Helicobacter pylori cagA Gene of Patients with Gastritis and Gastric Adenocarcinoma from the Brazilian Amazon Region. *Int J Bacteriol.* 2014;2014:1-6. doi: 10.1155/2014/418063.
17. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology.* 2007;133(2):659-72. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.026.
18. Hatakeyama M. Structure and function of Helicobacter pylori CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(4):196-219. doi: 10.2183/pjab.93.013.

Поступила 16.11.2018

УДК 616.66:616.13-089

СПОСОБ МОБИЛИЗАЦИИ НИЖНЕЙ НАДЧРЕВНОЙ АРТЕРИИ ДЛЯ РЕВАСКУЛЯРИЗИРУЮЩИХ BYPASS ОПЕРАЦИЙ ПОЛОВОГО ЧЛЕНА

Э. А. Повелица¹, А. М. Шестерня¹, Е. Е. Анашкина², О. В. Пархоменко¹

¹Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»
г. Гомель, Республика Беларусь

²Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь

Эффективность микрохирургических реваскуляризирующих операций, выполненных по показаниям, составляет от 85,3 % на протяжении первых трех лет наблюдения и до 65,5 % - при пятилетнем наблюдении. Эти данные являются важным подтверждением необходимости совершенствования как показаний к подобного рода операциям, так и техники самих операций. Выполнено пять реваскуляризирующих операций по методике Virag II и Michal II в модификации Sharlip с удовлетворительным результатом. У одного пациента была выполнена комбинированная двухэтапная реваскуляризация, включавшая первым этапом ангиопластику и установку стента в общую подвздошную артерию и вторым этапом – открытую реваскуляризацию полового члена. Во всех случаях в качестве донорской артерии для bypass эпигастрико-пенильного анастомоза использовалась нижняя надчревная артерия (a. epigastrica inferior).

В статье обсуждаются вопросы мобилизации указанной артерии для использования в качестве донорского шунта, а также способы профилактики и диагностики артериального тромбоза в ней в послеоперационном периоде с использованием дуплексного и ангиографического исследования.

Ключевые слова: эпигастрико-пенильный анастомоз, эректильная дисфункция.

The effectiveness of microsurgical revascularization performed according to indications ranges from 85.3% within the first three years of observation and up to 65.5 % during a five-year follow-up. These data are significant evidence of the necessity to rationalize both the indications for this kind of surgery and the surgical techniques. Five revascularization operations were performed using the Virag II and Michal II technique in the Sharlip modification with a satisfactory result. Two-stage combined revascularization, including angioplasty and stent placement in the common iliac artery as the first stage and open penile revascularization surgery as the second stage was performed in one patient. In all the cases, the lower epigastric artery (epigastrica inferior) was used as a donor artery for bypass epigastric-penile anastomosis. The article discusses issues of the mobilization of the above artery for its use as a donor shunt, as well as methods of prevention and diagnosis of arterial thrombosis in it in the postoperative period with the use of duplex ultrasound and angiography.

Key words: epigastric-penile anastomosis, erectile dysfunction.

Problemy zdorov'ya i ekologii. 2018 Oct-Dec; Vol 58 (4): 93-98

A Method of Mobilization of the Lower Epigastric Artery for Bypass Penile Revascularization Surgery

E.A. Povelitsa, A.M. Shesternya, E.E. Anashkina, O.V. Parhomenko