

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНОТИПОВ *VACA* И *CAGA* *HELICOBACTER PYLORI* У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ ГОРОДА ВЛАДИВОСТОКА

Ляликова Ю. В., Мирошниченко В. А., Тищенко Н. М., Стенкова А. М., Кораблёва Э.В., Лосева Н. Н., Ивановская М. А., Точилин И. К., Исаева М. П., Рассказов В. А.

ГБОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра госпитальной педиатрии (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), e-mail: mail@vgmu.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук (г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, д. 159), e-mail: piboc.dvo.ru

В статье освещается одна из актуальных проблем гастроэнтерологии – генотипирование бактерии *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) по генам *vacA* и *cagA* у детей с гастродуоденальной патологией и у взрослых пациентов с раком желудка. Наиболее часто (85%) *H. pylori* обнаруживалась в группе детей из семей, где у родственников был диагностирован рак желудка. У детей с хроническими гастродуоденальными заболеваниями выявляемость *H. pylori* была ниже (53%). Во всех клинических группах преобладающим генотипом *H. pylori* по *vacA* гену был *vacAs1m1* (55,5%), тогда как *vacAs2m1* генотип встречался реже всех (2,2%). Ген *cagA* наиболее часто встречался у больных с раком желудка (71,4%, $p < 0,01$) по сравнению с группой детей с гастродуоденальной патологией (34,4%). Большинство *vacAs1* штаммов являлось *cagA* позитивными.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, ген *vacA* и *cagA*, генотипирование, рак желудка, гастродуоденит.

DISTRIBUTION OF *VACA* AND *CAGA* GENOTYPES OF *HELICOBACTER PYLORI* FROM CHILDREN AND ADULTS OF VLADIVOSTOK

Lyalikova U. V., Miroshnichenko V. A., Tischenko N. M., Stenkova A. M., Korableva E. V., Loseva N. N., Ivanovskaya M. A., Tochilin I. K., Isaeva M. P., Rasskazov V. A.

GBOU VPO "Vladivostok State Medical University of the Health Ministry of Russia", Vladivostok, Russia (690002, Vladivostok, Prospect Ostryakova, 2), e-mail: mail@vgmu.ru

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia. Tel.: 7 (423) 231-14-30

The article highlights one of the pressing problems of Gastroenterology – genotyping of the bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) by *vacA* and *cagA* genes in children with gastroduodenal pathology and adults with gastric cancer. More frequently (85%) *H. pylori* was detected in the group of children from families with relatives with gastric cancer. In the group of children with chronic gastroduodenal pathology *H. pylori* was detected rarely (53%). In all clinical groups the predominant genotype of *H. pylori vacA* gene was *vacAs1m1* (55,5%), whereas the less common genotype was *vacAs2m1* (2.2%). *CagA* gene was the most frequently detected in patients with gastric cancer (71.4%, $p < 0.01$) compared with a group of children with gastroduodenal pathology (34.4%). Most *vacAs1 H. pylori* strains were *cagA* positive.

Key words: *Helicobacter pylori*, the gene *vacA* and *cagA*, genotyping, gastric cancer, gastroduodenitis.

Введение

В последние годы отчетливо прослеживается тенденция к повышению частоты встречаемости гастродуоденальной патологии у детей, которая, по данным различных авторов, составляет 220–310 случаев на 1000 детей. Наиболее частой причиной гастродуоденальной патологии является хеликобактерная инфекция. В России уровень инфицированности детей *H. pylori* составляет 60–70% [1; 4]. Эпидемиологические исследования во Владивостоке, проводимые Кораблёвой Э.В. [3], показали высокую распространённость хеликобактерной инфекции – 548 случаев на 1000 детей, выявленных при проведении углубленных осмотров школьников. *H. pylori* присутствует более чем у

половины людей во всем мире и является фактором риска развития язвенной болезни, аденокарциномы желудка и опухоли, развивающейся из лимфоидной ткани (MALT-лимфома) [9; 10].

Гастродуоденальные заболевания, ассоциированные с *H. pylori*, отличаются большим разнообразием морфологических и клинических проявлений. Вопрос о том, что определяет развитие той или иной формы заболевания, является наиболее сложным, и до настоящего времени не решен. Большинство исследователей высказывают предположение о ведущем значении внутривидового разнообразия штаммов *H. pylori* [4; 6].

В настоящее время ведутся активные исследования штаммов *H. pylori*, специфичных для развития конкретных гастродуоденальных заболеваний, ассоциированных с *H. pylori* [7]. Сообщения о роли различных штаммов в развитии гастродуоденальной патологии очень противоречивы. Все это не дает угаснуть научному интересу к данному микробу. Вследствие этого изучение особенностей различных по генетической структуре и вирулентности штаммов *H. pylori*, способных оказывать влияние на клиническое течение заболеваний, морфологических изменений слизистой оболочки желудка (СОЖ), а также эффективность терапии данной патологии является актуальной задачей современной медицины.

Целью и задачами данной работы явилось изучение частоты встречаемости различных генотипов *H. pylori* (таких как *vacA* и *cagA*) у детей с хроническими воспалительными заболеваниями верхних отделов пищеварительного тракта, у детей из семей с отягощенным анамнезом и у взрослых с раком желудка, а также их влияние на клинические и морфологические проявления.

Материалы и методы исследования

В основу работы вошли результаты обследования 135 детей в возрасте от 7 до 17 лет, поступивших на лечение в условиях дневного стационара КГБУЗ «Владивостокская больница № 3» с различными заболеваниями верхних отделов желудочно-кишечного тракта, и 40 взрослых пациентов с раком желудка. Все пациенты были разделены на три группы: первую составляли 115 детей с хроническими гастродуоденальными заболеваниями; вторую – 20 впервые обследовавшихся детей из семей с отягощенным анамнезом по раку желудка у близких родственников и имеющих в анамнезе хроническую патологию органов пищеварения; и третью группу – 40 пациентов с раком желудка.

Исследование было одобрено к проведению этическим комитетом ГБОУ ВПО «ВГМУ» Минздравсоцразвития России. Для постановки диагноза исследовали данные анамнеза, объективный осмотр, лабораторные и инструментальные исследования (эзофагогастродуоденофиброскопия с прицельной биопсией слизистой оболочки пораженного участка желудка). Верификацию диагноза проводили с использованием Сиднейской классификации (1996). Для идентификации *H. pylori* применяли быстрый

уреазный тест ХЕЛПИЛ (ООО «АМА», Россия) в соответствии с инструкцией, а также постановку ПЦР. Для ПЦР использовали ДНК, выделенную набором «NucleoSpin Tissue» (Macherey-Nagel, Германия) из биоптатов антрального отдела желудка и опухолевой ткани. Амплификацию проводили в приборе «GeneAmp PCR system 2700» (Applied Biosystems, США) с праймерами для «гнездовой» ПЦР (табл. 1). Все реакции были выполнены с использованием GoTaq полимеразы (Promega, США). Режим амплификации для всех пар праймеров: 5 мин при 95 °С, 35 циклов – 20 с при 94 °С, 20 с при 55 °С, 30 с при 72 °С. Продукты амплификации 16S рДНК, а также генов *vacAm* и *cagA* *H. pylori* идентифицировали в 1,5%-ном агарозном геле, а *vacAs* – в 5%-ном полиакриламидном геле в присутствии бромистого этидия. Полученные в результате исследования медико-биологические данные обрабатывали в программе STATISTICA (версия 6).

Результаты исследования и их обсуждение

Выявление *H. pylori* 16S рДНК (маркер, который свидетельствует об инфицированности *H. pylori*) показало, что наиболее часто (85%) *H. pylori* обнаруживалась во II группе пациентов (дети из семей, где у родственников был диагностирован рак желудка) (табл. 1). В первой группе детей генетический материал *H. pylori* обнаруживали у 53%, в то время как, по данным Мишкиной Т.В. и соавторов (2007), *H. pylori* обнаруживалась у 75,7% пациентов, что в 1,4 раза выше по сравнению с нашими данными. После тщательного изучения анамнеза выяснилось, что большинство пациентов этой группы получало антибактериальные препараты широкого спектра действия по поводу *H. pylori*-инфекции, других заболеваний и осложнений после перенесенных ОРВИ. Для определения *H. pylori* в третьей группе использовали послеоперационный материал, частота обнаружения 16S рДНК *H. pylori* составила 70%. В этой группе также перед операцией больные получали антибактериальные препараты с целью профилактики послеоперационных осложнений.

Таблица 1 – Обнаружение 16S rDNA *Helicobacter pylori* в обследуемых группах (абс. ч., $P \pm mр$, %)

<i>H. pylori</i>	I группа (n=115)	II группа (n=20)	III группа (n=40)
<i>H. pylori</i> - позитивный	61 53,0±4,7	17**** 85,0±8,2	28* 70,0±7,3
<i>H. pylori</i> - негативный	54 47,0±4,7	3 15,0±8,2	12 30,0±7,3

**** $p_1 < 0,001$ – достоверность различий между I и II группами *H. pylori* (+);

* $p_3 < 0,05$ – достоверность различий между I и III группами *H. pylori* (+).

Одним из факторов патогенности *H. pylori* является ген *vacA* (vacuolating-associated cytotoxin). Продуктом этого гена является цитотоксин, выработка которого приводит к повреждению эпителиальных клеток СОЖ. Формирование пор в цитоплазматической мембране, увеличение проницаемости анионов через эти каналы и образование вакуолей внутри эпителиоцитов является свойством всех VacA-продуцирующих штаммов *H. pylori* [9]. В наших исследованиях среди 16S рДНК положительных образцов *vacA* обнаружен в 86,8% случаев. Возможно, это связано с небольшим количеством генетического материала *H. pylori* в некоторых образцах.

Оперон *vacA* обладает мозаичной структурой и содержит вариабельные части: s-регион (кодирующий сигнальный пептид) и m-регион (кодирующий средний участок зрелого белка). Описаны различные по размеру и нуклеотидной последовательности аллельные варианты этого гена: *s1* или *s2*, и *m1* или *m2* соответственно. В нашем исследовании наиболее распространенным генотипом *H. pylori* был *vacAs1*, который одинаково часто встречался во всех исследуемых группах (60,6; 82,4; 82,1%), (табл. 2). При этом *vacAs2* генотип встречался у 17,9% больных с хронической гастродуоденальной патологией, в 3,6% случаях в группе больных с раком желудка и только в сочетании с *vacAs1* (микст-инфекция) в 17,6% случаев у детей из семей с отягощенной наследственностью по раку желудка. Доля смешанных генотипов (*vacAs1/s2*) в остальных группах составила 1,6% (группа I) и 3,6% (группа III). В то время как генотип *H. pylori vacAm1* обнаруживали у 60,7% в III группе, 59,0% в I группе и 47,1% во II группе; а *vacAm2* встречался во II группе – 47,1%, 45,9% – в I группе и в III группе – 25,0%. Во всех группах преобладающим являлся генотип *H. pylori vacAs1*.

Так же нами были проанализированы сочетания аллелей сигнального и среднего участков *vacA* гена (рис. 1). Генотип *vacAs1m1* связывают с высокой цитотоксичностью [5]. В наших исследованиях *vacAs1m1* встречался чаще (55,5%), чем остальные варианты. Наиболее редким генотипом был *vacAs2m1* (2,2%).

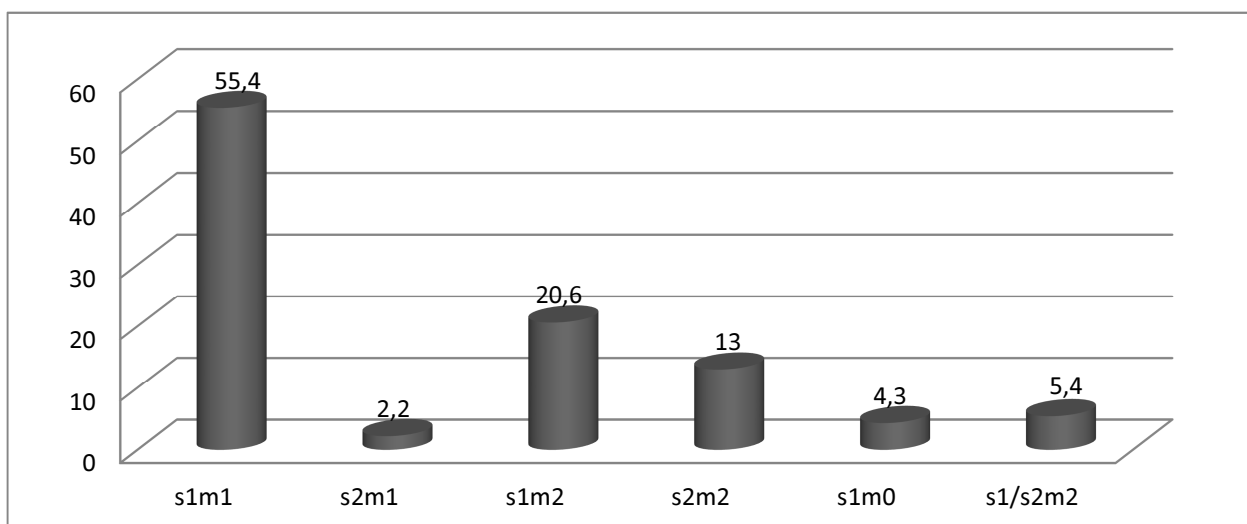


Рис. 1. Распределение вариантов генотипов *vacA H. pylori*.

Ген *cagA* (cytotoxin-associated gene), маркер острова патогенности (PAI), который кодирует белки IV секреторной системы *H. pylori*. Функция этой системы состоит в доставке эффекторных молекул в клетки макроорганизма. Они позволяют *H. pylori* модулировать метаболизм эпителиоцитов СОЖ, включая экспрессию протоонкогенов [8]. Инфицирование *cagA*-позитивными штаммами *H. pylori* повышает риск развития воспалительного процесса в СОЖ [5]. Генотип *cagA* наиболее часто встречался у больных с раком желудка (71,4%, $p < 0,01$) по сравнению с группой детей с гастродуоденальной патологией (34,4%).

Таблица 2 – Распределение генотипов *vacA* и *cagA H. pylori* в клинических группах, (абс. ч., $P \pm mр$, %)

Генотипы <i>H. pylori</i>	I группа (дети с гастродуоденальной патологией) (N=61)	II группа (дети из семей с раком желудка) (N=17)	III группа (пациенты с раком желудка) (N=28)
<i>vacAs1</i>	37* 60,6±6,6	14 82,4±9,2	23 82,1±7,2
<i>vacAs2</i>	12*** 17,9±4,7	0 0,0±0,0	1 3,6±3,5
<i>vacAs1/s2</i>	1 1,6±1,6	3 17,6±9,2	1 3,6±3,5
<i>vacAm1</i>	28** 45,9±6,4	8 47,1±12,1	17 60,7±9,3
<i>vacAm2</i>	20 32,8±1,1	8 47,1±12,1	7 25,0±8,2
<i>cagA</i> (+)	21 34,4±6,1	10 58,8±11,9	20**** 71,4±8,5
<i>cagA</i> (-)	40 65,6±6,1	7 41,2±11,9	8 28,6±8,5

* $p_1 < 0,01$ – достоверность различий между *vacAs1* и *s2* в первой группе;

** $P_2 < 0,01$ – достоверность различий между *vacAm1* и *s1* в первой группе;

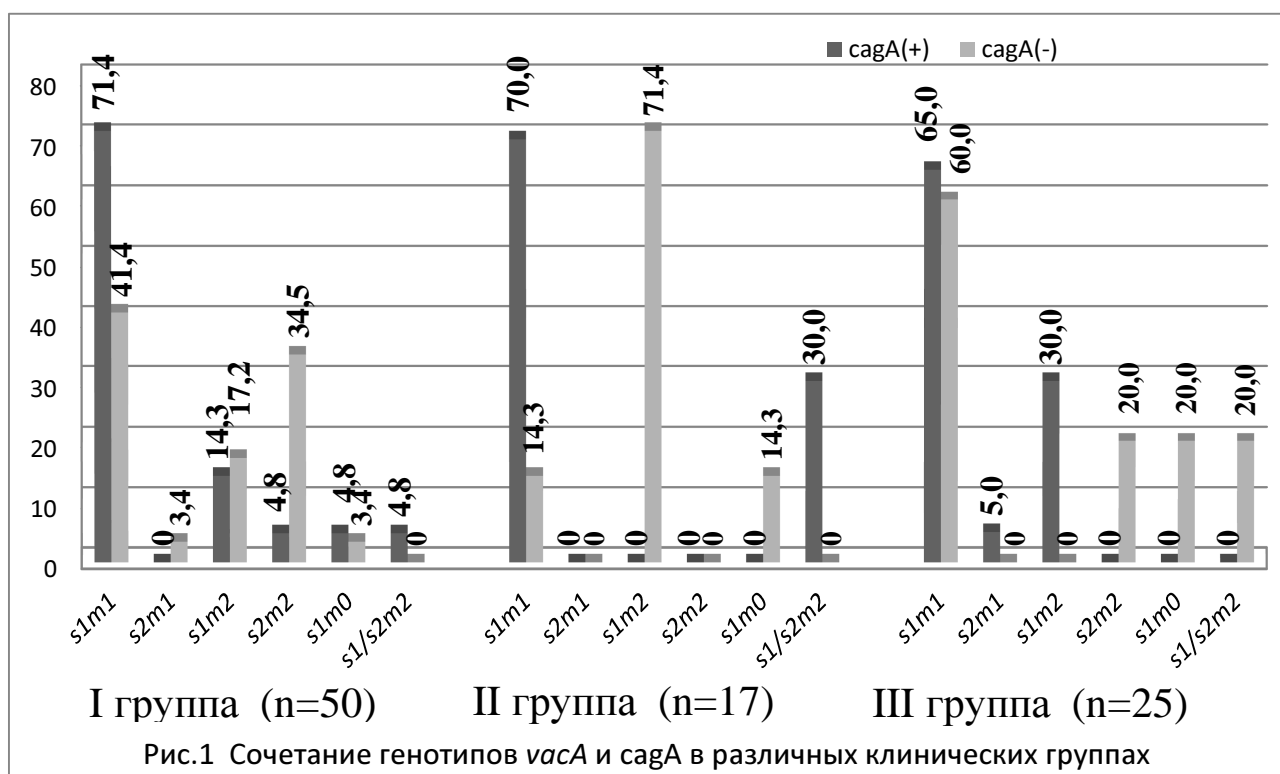
*** $P_3 < 0,01$ – достоверность различий между *vacAs2* в первой и третьей группе;

**** $P_4 < 0,01$ – достоверность различий между *cagA*(+) в первой и третьей группе.

Характерной особенностью наших исследований было нахождение высокого процента встречаемости генотипа *vacAs1* – 83%, что значительно отличается от данных, полученных в работе Маева И.В. (2004) [5], где обнаружение этого генотипа составило 63%, что в 1,3 раза реже, чем в наших исследованиях. В Татарстане, по данным Исаевой Г.Ш. и соавторов (2008)

[2], этот показатель составлял 55,4%, что в 1,5 раза реже, по сравнению с нашими данными. Генотип *H. pylori vacAs1* в Санкт-Петербурге, по данным Мишкиной Т.В. и соавторов (2007) [7], обнаруживали у детей с гастродуоденальной патологией только у 7,3%, что в 11,5 раз реже, чем в нашем регионе. Генотип *cagA* встречался в нашем регионе в 48,1%, что в 1,8 раза реже, чем в Москве (93%), и в 1,3 раза реже, чем в Татарстане (73,2%). В Санкт-Петербурге находили ген *cagA* – в 7,91%, что в 4,3 раза реже, чем в наших исследованиях. Эти различия обусловлены региональными особенностями циркулирующих популяций *H. pylori*.

Известно, что между генотипами *vacA* и *cagA* *H. pylori* существует взаимосвязь. Большинство *vacAs1* штаммов являются *cagA*-позитивными и обладают наибольшей активностью к адгезии и внутриклеточной инфильтрации. Штаммы *H. pylori*, вырабатывающие активный белок VacA (*s1* типа), как правило, содержат и *cagA*, а в штаммах, синтезирующих неактивные белки VacA (*s2* типа), ген *cagA* обычно отсутствует [5; 10]. Встречаемость *vacAs1cagA* генотипа в нашем исследовании составила 71,4% в группе I; 70,0% – в группе II; 65,0% – в группе III (рис. 2). Это свидетельствует о высокой представленности данного генотипа в местной популяции *H. pylori*, а также о ее высоком вирулентном потенциале.



Выводы

1. В данном исследовании достоверно чаще ($p < 0,001$) выявляли хеликобактерную инфекцию у детей из семей с раком желудка (85%), и у больных с раком желудка (70%), чем у детей с гастродуоденальной патологией без отягощенной наследственности по раку желудка (53%). Это указывает на необходимость обязательного обследования на инфекцию *H. pylori* детей с отягощенным анамнезом.
2. Наиболее распространенными генотипами *vacA* *H. pylori* были *vacAs1*, которые в большинстве случаев были *cagA*-позитивными.
3. Во всех клинических группах наиболее частым генотипом *H. pylori* был *vacAs1m1* (55,4%).
4. Ген *vacAs2* встречался у детей с гастродуоденальной патологией, в то время как у детей с отягощенным анамнезом по раку желудка этот штамм встречался в виде микст-инфекции в сочетании с *vacAs1*, а у раковых больных – только в 3,6% случаев.
5. Выявлены различия в распределении *vacA* и *cagA* генотипов *H. pylori* в разных регионах России, что, возможно, свидетельствует о наличии региональных особенностей в циркуляции различных популяций этой бактерии.

Список литературы

1. Бельмер С.В. Практическое руководство по детским болезням: в 2-х томах / С.В. Бельмер, А.И. Хавкин. – М., 2003. – Т. 2. Гастроэнтерология детского возраста. – 121 с.
2. Исаева Г.Ш., Муравьев В.Ю. Распределение генотипов *Helicobacter pylori* в республике Татарстан // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2008. – № 1. – С. 11-15.
3. Кораблева Э.В. Клинико-эпидемиологические особенности *Helicobacter pylori* инфекции у детей и подростков : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Владивосток, 2010. – 24 с.
4. Корниенко Е.А. Проблемные вопросы эрадикационной терапии в условиях высокой антибиотикорезистентности // Вопр. детской диетологии. – 2007. – Т. 5. – № 1. – С. 77–78.
5. Маев И.В. [и др.] Генотипирование *Helicobacter pylori* // Клиническая медицина. – 2004. – № 7. – С. 4-9.
6. Мирошниченко В.А. Заболевания гастродуоденальной системы – наиболее распространенная патология органов пищеварения у детей и подростков // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 53-55.
7. Мишкина Т.В., Александрова В.А., Суворов А.Н. Влияние различных генотипов *Helicobacter pylori* на клинико-эндоскопические и морфологические проявления хронических гастродуоденальных заболеваний у детей и подростков // Педиатрия. – 2007. – Т. 86. – № 5. – С. 28-32.
8. Cover T.L. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* // Mol. Microbiol. – 1996. – 20: 241-246.

9. Kelly A., Gangwer Carrie L. et al. Molecular evolution of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin gene VacA // J. Bacteriol. – 2010. – № 23. – P. 6126-6135.

10. Oldani A., Cormont M., Hofman V. et al. *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5. – 1000603 p.

Рецензенты:

Осин А.Я., доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской педиатрии ГБОУ ВПО «ВГМУ» Минздравсоцразвития России, г. Владивосток.

Ни А., доктор медицинских наук, доцент кафедры педиатрии ФПК и ППС, иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО «ВГМУ» Минздравсоцразвития России, г. Владивосток.