

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *HELICOBACTER PYLORI*, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К КЛАРИТРОМИЦИНУ

© Калугин А.А.¹, Степченко А.А.¹, Воронаев Е.В.², Осипкина О.В.², Зятков А.А.²

¹ Кафедра внутренних болезней факультета последипломного образования Курского государственного медицинского университета, Курск; ² Научно-исследовательская лаборатория Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, Республика Беларусь

E-mail: dr.kalugin2010@yandex.ru

Статья посвящена изучению полиморфизма генов *Helicobacter pylori*, ассоциированных с устойчивостью к кларитромицину – мутации T2182C, A2142G/C и A2143G, методом полимеразной цепной реакции (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Исследован биопсийный материал из измененных участков слизистой желудка, взятый у пациентов, находившихся на амбулаторном приеме в поликлиниках г. Курска и направленных для проведения фиброэзофагогастродуоденоскопии в рамках дифференциальной диагностики гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и диспепсического синдрома. Проведенные исследования не выявили мутацию A214G/C в исследуемом биопсийном материале. Установлено, что мутация T2182C выявлена с частотой 10,3%, мутация A2143G – в 13,79% случаев. Таким образом, частота мутаций HP, определяющая устойчивость к кларитромицину составила 24,13%, что обосновывает использование в Курске резервных эрадикационных схем первой и второй линии для лечения HP-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, полиморфизм генов, устойчивость к кларитромицину.

INCIDENCE OF DETECTING POLYMORPHISM OF *HELICOBACTER PYLORI* GENES ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO CLARITHROMYCIN

Kalugin A.A.¹, Stepchenko A.A.¹, Voropaev E.V.², Osipkina O.V.², Zyatkov A.A.²

¹ Department of Internal Diseases of Post-Graduate Education Faculty of Kursk State Medical University, Kursk;

² Scientific and Research Laboratory of Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

The article is devoted to the investigation of polymorphism of *Helicobacter pylori* genes associated with resistance to Clarithromycin (T2182C, A2142G/C, and A2143G mutation) using the polymerase chain reaction (restriction fragment length polymorphism). The following was investigated: the biopsy material from altered areas of gastric mucosa obtained from outpatients of Kursk city polyclinics and referred to fibroesophagogastroduodenoscopy in order to conduct the differential diagnostics between the gastroesophageal reflux disease and the dyspeptic syndrome. During the research, no cases of A214G/C mutation were detected in the investigated biopsy material. It was found out that T2182C mutation was detected in 10.3% of cases, while mutation A2143G – in 13.79% of cases. Thus, the incidence of HP mutations related to the resistance to Clarithromycin is 24.13%, which is the rationale for the use of reserved 1st- and 2nd-line eradication schemes to treat HP-associated diseases in city of Kursk.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gene polymorphism, resistance to Clarithromycin.

Согласно рекомендациям Европейской группы по изучению *Helicobacter pylori* (HP) (Маастрихтский консенсус – 4), эрадикацию HP рекомендовано проводить не только при хеликобактер-ассоциированных формах хронического гастрита, язвенной болезни, MALT-лимфоме желудка после операции по поводу дистального рака желудка, но и при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) [13].

К настоящему времени установлено, HP имеет широкий спектр чувствительности к антимикробным препаратам. При этом «дикие» штаммы *H. pylori* чувствительны *in vitro* к бета-лактамам антибиотикам (за исключением цефсулодина), макролидам, нитроимидазолам, нитрофуранам, тетрациклинам, фторхинолонам, фосфомоцину, фениколам, аминогликозидам, хлорамфениколу, рифампицину и препаратам висмута [10]. Следует

отметить, что в схемы эрадикации входит лишь ограниченный набор препаратов (кларитромицин, амоксициллин, метронидазол, тетрациклин, левофлоксацин и препараты висмута) [9]. Резистентность HP к антимикробным препаратам является определяющим фактором эффективности существующих режимов эрадикации микроорганизма [5, 6]. Однако при резистентности к кларитромицину, превышающей 15-20%, стартовая антихеликобактерная терапия не обеспечивает приемлемого уровня эрадикации 85-90% [6], поэтому уровень резистентности HP к кларитромицину в популяции является определяющим фактором при выборе схемы эрадикации [13]. Кроме того, подобно другим патогенам, HP имеет региональные особенности резистентности. В то же время невозможно экстраполировать данные о резистентности, выявленные в одной стране (регио-

не), на другую, в силу значительных региональных различий чувствительности микроорганизмов [11].

В связи с вышеизложенным, целью исследования явилось определение полиморфизма (точечных мутаций) генов *Helicobacter pylori*, ассоциированных с устойчивостью к кларитромицину, выявленных в биопсийном материале, взятом из измененных участков слизистой желудка амбулаторных пациентов поликлиник г. Курска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 50 пациентов, находившихся на амбулаторном приеме в поликлиниках г. Курска и направленных для проведения фиброэзофагогастродуоденоскопии (ФЭГДС) в рамках дифференциальной диагностики ГЭРБ, функциональной и органической диспепсии. Среди обследованных пациентов 31 человек находился на диспансерном наблюдении по поводу заболеваний желудочно-кишечного тракта, 7 – по поводу кардиологической патологии, 12 больных – с заболеваниями легких, почек и других заболеваний. Среди пациентов было 30 мужчин и 20 женщин в возрасте от 22 до 54 лет (средний возраст составил 34 ± 16 лет). Пациенты были полностью информированы о целях, задачах и содержании исследования. Из исследования были исключены пациенты, ранее получавшие антимикробную терапию для эрадикации НР и антибиотики из группы макролидов в течение одного года, предшествовавшего данному исследованию; участвующие в любых других клинических исследованиях; получающие ингибиторы протонного насоса и препараты висмута в течение двух недель, предшествовавших данному исследованию; а также пациенты, принимающие антибактериальную терапию на момент забора материала.

Во время проведения ФЭГДС у всех обследованных пациентов была взята биопсия не менее чем из 3 измененных участков слизистой желудка. Образцы биоптатов, погруженные в физраствор, замораживались при -20°C в стерильных стеклянных баночках. Баночки были пронумерованы, сгруппированы в две коробки по 25 образцов в каждой. Общее количество образцов составило 50 штук.

Выявление ДНК *Helicobacter pylori* проводилось с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Определение полиморфизма генов *Helicobacter pylori*, ассоциированных с устойчивостью к кларитромицину (мутации T2182C, A2142G/C и A2143G), проводили методом ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фраг-

ментов), суть которого заключается в амплификации определенного фрагмента ДНК, содержащего анализируемую мутацию, с последующим расщеплением полученного ампликона соответствующей рестриктазой для идентификации аллелей анализируемого гена [13]. Для проведения ПЦР, электрофоретической детекции и рестрикционного анализа использовали реагенты фирмы «Thermo Scientific» (США). Праймеры синтезированы ОДО «Primetech» (Беларусь). Амплификацию проводили, используя амплификатор «Palm Cycler» фирмы «Corbett Research» (Австралия). Рестрикционный анализ проводили с применением коммерческих рестриктаз согласно инструкции производителя. Детекцию продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов проводили с помощью горизонтального гель-электрофореза. Электрофорез проводили по стандартной схеме, используя электрофоретическую камеру фирмы «Helicon». Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов проводили в агарозном геле (1,7% и 2,0% соответственно). Для окрашивания применяли раствор бромистого этидия. В качестве контроля использовали маркер молекулярного веса GeneRulerTM 50 bp DNA Ladder («ThermoScientific», США). Для визуализации полученных результатов использовали видеосистему фирмы «Bio-Rad» (США) GelDocXR, для переноса изображения на компьютер и регистрации протоколов использовали программу «Quaniti One» той же фирмы.

На первом этапе из всех образцов были получены препараты суммарной ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием колоночного набора Genomic DNA from tissue («Macherey-Nagel», Германия), а также Genomic DNA Purification Kit («Thermo Scientific», США) согласно инструкции производителей.

Концентрацию и чистоту препаратов ДНК определяли с помощью спектрофотометра «Nanodrop 1000» производства фирмы «ThermoScientific» (США). Соотношение экстинкций A260/A280 выше 1,8 свидетельствует о чистоте препаратов ДНК, достаточной для дальнейшего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление ДНК человека проводили методом ПЦР с последующей электрофоретической детекцией, используя праймеры для амплификации фрагмента гена *Homo sapiens hemoglobin subunit beta* (HBB, beta-globin), используемого в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО).

После амплификации была проведена электрофоретическая детекция продуктов ПЦР. На рисунке 1 представлен электрофорез продуктов, полученных в результате ПЦР с праймерами HBG (амплифицируется специфический фрагмент размером 120 пар нуклеотидов – п.н.).

Как видно из рисунка 1, в образцах № 8, 9, 10, 11 не амплифицируется специфический фрагмент размером 120 п.н., являющийся внутренним контролем, соответственно в данных образцах отсутствует ДНК человека. Несмотря на предпринятые попытки выделить нуклеиновые кислоты из образцов № 8, 9, 10, 11 (использование разных методов выделения, проведение ПЦР на выявление ДНК человека и ДНК *Helicobacter pylori*), данные спектрофотометрического анализа свидетельствуют об отсутствии нуклеиновых кислот в образцах № 8, 9, 10, 11 после использования различных методов выделения. По-видимому, одним из факторов, затрудняющих выделение, является слишком маленький размер биоптатов, что привело к отсутствию ДНК в образцах № 8, 9, 10, 11. В связи с чем данные образцы были исключены из дальнейшего анализа.

Выявление ДНК *Helicobacter pylori* проводили методом ПЦР с последующей электрофоретической детекцией, используя праймеры для ампли-

фикации фрагмента гена 16S ribosomal RNA *Helicobacter pylori*.

После амплификации была проведена электрофоретическая детекция продуктов ПЦР. На рисунке 2 в качестве примера представлен электрофорез продуктов, полученных в результате ПЦР с праймерами 16S-Нр (амплифицируется специфический фрагмент размером 763 п.н.).

Следует отметить, что в результате ПЦР во многих образцах был амплифицирован специфический фрагмент размером 763 п.н. гена 16S ribosomal RNA *Helicobacter pylori*. В качестве положительного контроля использовали имеющиеся в лаборатории стандарты ДНК *Helicobacter pylori*.

В результате проведенного исследования, ДНК человека было выявлено в 46 образцах, из них в 36 образцах был выявлен специфический фрагмент, соответствующий участку гена 16S ribosomal RNA *Helicobacter pylori*. В этих образцах проводили определение полиморфизма гена 23s-rRNA *Helicobacter pylori* методом ПЦР-ПДРФ. ДНК *Helicobacter pylori* не была выявлена в образцах № 5, 15, 16, 17, 19, 26, 32, 36, 38, 44. Они были исключены из дальнейшего анализа. Кроме того, в образцах № 25, 28, 30, 31, 41, 42, 43 не оказалось возможным установить наличие и отсутствие искомых мутаций из-за малого количества исходного ДНК НР.

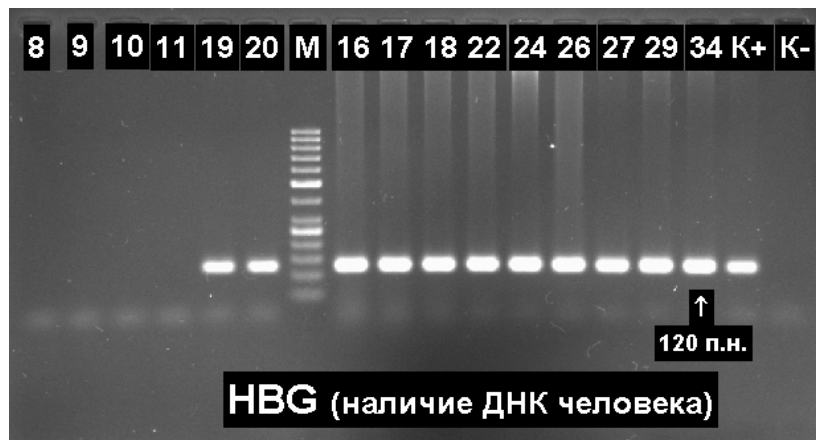


Рис. 1. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами HBG.

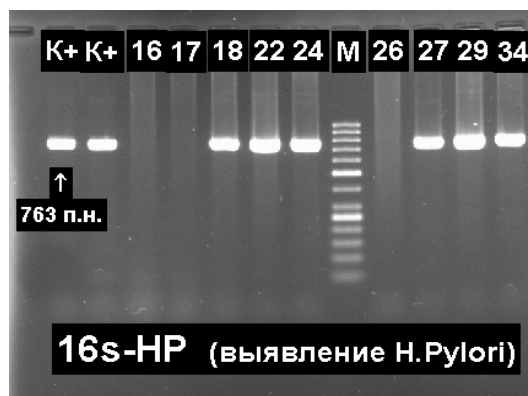


Рис. 2. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами 16S-Нр.

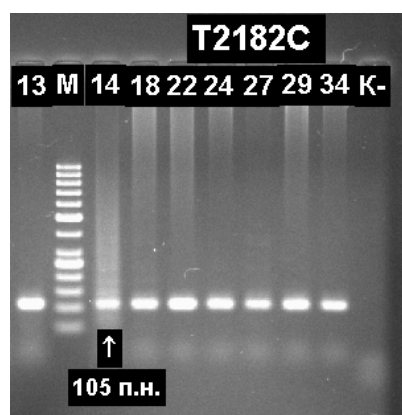


Рис. 3. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами T2182C.

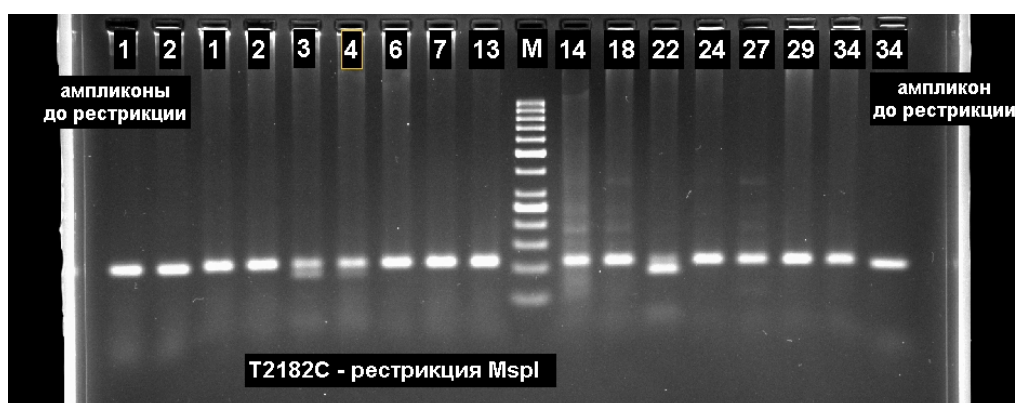


Рис. 4. Электрофоретическая детекция продуктов рестрикции для выявления полиморфизма T2182C.

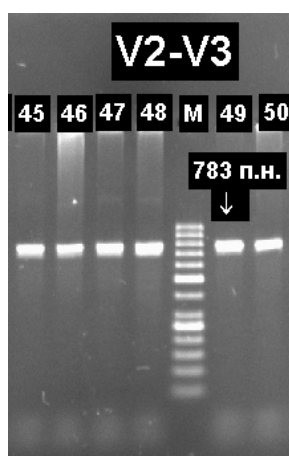


Рис. 5. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами V-2, V-3.

Выявление полиморфизма T2182C гена 23s-rRNA *Helicobacter pylori* включало амплификацию фрагмента гена 23s-rRNA *Helicobacter pylori* с использованием праймеров для детекции точечной мутации T2182C.

После амплификации была проведена электрофоретическая детекция продуктов ПЦР. На рисунке 3 в качестве примера представлен электрофорез продуктов, полученных в результате ПЦР с праймерами T2182C. Размер искомого фрагмента 105 п.н.

Для выявления полиморфизма T2182C, полученный в результате ПЦР фрагмент подвергают

рестрикционному анализу с использованием рестриктазы MspI. Электрофореграмма продуктов рестрикции приведена в качестве примера на рисунке 4, где мутация T2182C присутствует в трех образцах № 3, 4, 22. В остальных 26 образцах мутация отсутствует.

При выявлении полиморфизма A2142G/C и A2143G гена 23s-rRNA HP, амплификацию фрагмента гена 23s-rRNA *Helicobacter pylori* проводили с использованием праймеров для определения точечных мутаций A2142G/C и A2143G. После амплификации была проведена электрофоретическая детекция продуктов ПЦР. На рисунке 5 в

качестве примера представлен электрофорез продуктов, полученных в результате ПЦР с праймерами V-2, V-3. Размер искомого фрагмента составил 783 п.н.

Для выявления полиморфизма A2142G/C, полученный в результате ПЦР фрагмент подвергли рестрикционному анализу с использованием рестриктазы MboII. Два фрагмента на фореграмме (670 п.н. и 113 п.н.) соответствуют наличию мутации A2142G/C, один фрагмент (783 п.н.) свидетельствует об отсутствии мутации A2142G/C.

Для выявления полиморфизма A2143G, полученный в результате ПЦР фрагмент подвергли рестрикционному анализу с использованием рестриктазы BsaI. Два фрагмента на фореграмме (671 п.н. и 112 п.н.) соответствуют наличию мутации A2143G в гомозиготном состоянии, один фрагмент (783 п.н.) свидетельствует об отсутствии мутации A2143G, ни в одном из проанализированных образцов не выявлена искомая мутация A2142G/C. В то же время в 4-х образцах – 1, 18, 24 и 23 выявлена искомая мутация A2143G.

Таким образом, ДНК человека было выявлено в 46 образцах, из них в 36 образцах был выявлен специфический фрагмент, соответствующий участку гена 16S ribosomal RNA *Helicobacter pylori*. Таким образом, инфицированность составила 78,3%. В образцах № 5, 15, 16, 17, 19, 26, 32, 36, 38, 44 ДНК *Helicobacter pylori* не была выявлена.

Выявление мутаций T2182C, A2142G/C и A2143G, ассоциированных с устойчивостью к кларитромицину, проведено в 29 образцах ДНК *Helicobacter pylori*. Мутация T2182C присутствует в трех образцах № 3, 4, 22 из 29 (частота 10,3%). В остальных образцах искомая мутация отсутствует. Проведенные исследования показали, что мутация A2142G/C не была выявлена. Мутация A2143G выявлена в 4-х образцах 1, 18, 24 и 23 (частота 13,79%). Таким образом, частота мутаций НР, определяющая устойчивость к кларитромицину составила 24,13%, что обосновывает использование в Курске резервных эрадикационных схем первой и второй линии для лечения кислото-зависимых заболеваний, в том числе ГЭРБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ворopaева А.В., Ворopaев Е.В., Баранов О.Ю., Платошкин Э.Н., Шафранский А.А., Пиманов С.И., Макаренко Е.В. Молекулярно-генетическое тестирование мутаций гена 23S рPHK *Helicobacter pylori*, определяющих резистентность к кларитромицину в Беларуси // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2010. – № 1(3). – С. 30-35.
2. Дехнич Н.Н., Захарова Н.В., Кузьмин-Крутецкий М.И. Резолюция экспертного совещания «Тактика ведения пациента с инфекцией *Helicobacter pylori*. От простого к сложному» // Клин. микробиология и антимикробная химия. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 176-180.
3. Дехнич Н.Н., Костякова Е.А., Пунин А.А. Антибиотикорезистентность *H. pylori*: результаты микробиологического регионального исследования // РЖГГК. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 37-42.
4. Гастроэнтерология. Национальное руководство: краткое издание / под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 480 с.
5. Кудрявцева Л.В. Механизмы развития приобретенной антибиотикорезистентности *H. pylori* // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – № 2. – С. 39-41.
6. Маев И.В., Андреев Д.Н., Дичева Д.Т. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь: от патогенеза к терапевтическим аспектам // Consilium-medicum. – 2013. – Т. 15, № 8. – С. 30-34.
7. Рапопорт С.И. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь. (Пособие для врачей). – М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М». – 2009. – 12 с.
8. Симаненков В.И., Захарова Н.В., Жебрун А.Б., Сварваль А.В., Савилова И.В., Ферман Р.С. Резистентность *Helicobacter pylori* к антимикробным препаратам по результатам бактериологического тестирования // Лечащий врач. – 2015. – № 4. – С. 91.
9. Циммерман Я.С. Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии (Unsolved and Debatable Issues of Modern Gastroenterology) – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 224 с.
10. Glupczynski Y., Megraud F., Lopez-Brea M., Andersen L. European Multicentre Survey of in Vitro Antimicrobial Resistance in *Helicobacter pylori* // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2001. – Vol. 20, N 11. – P. 820-823.
11. Graham D. Y., Lee Y.C., Wu M.S. Rational *Helicobacter pylori* therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence // Clin Gastroenterol Hepatol. – 2014. – Vol. 12, N 22. – P. 177-186. – doi: 10.1016/j.cgh.2013.05.028.
12. Lambert T., Megraud F., Gerbaud G., Courvalin P. Susceptibility of *Campylobacter pyloridis* to 20 antimicrobial agents // Antimicrob. Agents Chemother. – 1986. – Vol. 30, N 3. – P. 510-511.
13. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Atherton J., Axon A., Bazzoli F., Gensini G.F., Gisbert J., Graham D., Rokkas T., El-Omar E., Kuipers E. Management of *Helicobacter Pylori* infection – Maastricht IV // Gut. – 2012. – Vol. 61, N 5. – P. 646-664. – doi: 10.1136/gutjnl-2012-302084.