

Абдурахимов А.А., Далимова Д.А, Турдикулова Ш.У., Мухамедов Р.С.

ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИК КАСАЛЛИКЛАРДА *HELICOBACTER PYLORI* БАКТЕРИЯСИ VacA ВА IceA ГЕНЛАРИНИНГ ТАКРОРЛАНИШ ДАРАЖАСИ

Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академияси Биоорганик кимё институти

Ўзбекистон шароитида *Helicobacter pylori* бактерияси VacA, IceA генларининг гастроэнтерологик касалликлар билан ассоциацияси етарлича ўрганилмаган. Айрим илмий манбаларда, [1, 2, 3] Оролбўйи ва Тошкент вилояти ҳудуди аҳолиларида учровчи *H. pylori* бактериясининг юқорида келтирилган генлари бўйича генотиплаш натижалари берилган.

H. pylori инфекцияси Осиё минтақасида 70–80%, Африкада 70–90%, Шимолий Америкада 30–40%, Жанубий Америкада 80–90%, Европада 30–70% учраган. Ривожланган мамлакатларда инфекцияланиш кўрсаткичининг камлигини кўриш мумкин [4].

Одамлар ошқозонидаги *H. pylori* бактерияси генотибида мавжуд бўлган бир қанча CagA, VacA, IceA, BabA каби генлар бактерияга патогенлик беради.

VacA (vacuolating-associated cytotoxin) оксиди тажрибаларда эпителиал хужайра ичи вакуола-сини ривожланишига ва қўзғалишига сабаб бўлади. Бундан ташқари хужайра цитоскелетини ўзгаришига ҳам олиб келади [5]. IceA (induced by contact with epithelium) икита аллель формаси мавжуд бўлиб, улар iceA1 ва iceA2. iceA1 генини ошқозон яраси касаллигини маркери деб аташган. iceA1 гени оксидининг ошқозон эпителиал хужайрасини адгезияга олиб келади [6]. VacA гени s регионининг s1, s2 типлари, m регионининг m1, m2 типлари мавжуд бўлиб, s1 типининг sla, slb, slc субтиплари, m1 типининг mla, mlb, m1c, m1d субтиплари аниқланган, m2 типиди эса m2a ва m2b субтиплари фарқланади [7].

Турли популяцияларда гастрит, ошқозон яраси ва ўн икки бармоқли ичак яраси билан VacA гени ўртасидаги ассоциацияси ўрганилган. Колумбияда sla/m1, АҚШда slb/m1, Япония ва Кореяда slc/m1 аллеллари бошқа аллелларга нисбатан кўп учраган. Колумбияда ўн икки бармоқли ичак ярасида VacAs1/IceA1, гастрит ва ошқозон ракида VacAs1/IceA2, АҚШда гастрит, ошқозон раки ва ўн икки бармоқли ичак яраси касаллик-ларида VacAs1/IceA2 комбинациялари бошқа комбинацияларга нисбатан кўп учраган. Корея ва Японияда гастрит, ошқозон раки ва ўн икки

бармоқли ичак яраси касалликларда VacAs1/IceA1 доминант ҳолда учраган [8]. Болгарияда *H. pylori* генотипланганда IceA1 69,3%, IceA2 30,7%, VacAs1 89,2%, VacAs2 10,8%, VacAm1 39,8%, VacAm2 60,2% эканлиги аниқланган [9]. Япония ва Кореяда VacA генининг slc, mlb, Тайванда slc, mlb, m2, Гонгконгда slc, mlb, m2, Вьетнамда slc, mlb, Покистонда sla, m2, Италияда sla, s2, mla, m2, Францияда sla, slb, mla, m2, Жанубий Африкада slb, mla, Канадада sla, mla, m2, АҚШда slb, sla, s2, mla, m2, Колумбияда sla, slb, s2, mla, m2 субтиплари кўп учраган [10]. Кореяда VacA генининг slc/ml субтип-лари кўп учраган. Жумладан, ошқозон ярасида 44%, ўн икки бармоқли ичак ярасида 71%, ошқозон ракида 40,9%, гастритда 52,4% топил-ган. CagA гени ошқозон ярасида 84%, ўн икки бармоқли ичак ярасида 96,8%, ошқозон ракида 86,4%, гастритда 92,9% намоён бўлган [11]. Хи-тойда VacA генининг s2 типи топилмаган, VacA m2, IceA1 генлари кўп учраган. VacA генининг slc субтипи ва VacAm2/IceA1 комбинацияси бошқа комбинацияларга қараганда кўп учраган [12].

Тадқиқотнинг мақсади сифатида Наманган, Тошкент вилояти ва Тошкент шаҳрида истикомат қилувчи ошқозон ичак касалликлари-га чалинган беморлар ошқозонидан *H. Pylori* бактерияси ДНКсини ажратиб олиш ҳамда VacA, IceA генларининг учрашини ўрганиш қўйилди.

Материал ва методлар: Ўзбекистоннинг Наманган, Фарғона, Тошкент вилоятида ҳамда Тошкент шаҳрида яшовчи ошқозон ичак касал-ликларига чалинган жами 135 та беморлар ошқозонидан биопсия намуналари йиғилди. Йиғилган биопсия намуналаридан Diatom™ DNA Prep 200 (“ИзоГен лабораторияси”, Россия) реагентлар тўплами ёрдамида бактерия (одам ошқозон эпителий тўқималари ДНКси билан аралашган) ДНКси нуклеосорбция усулида аж-ратиб олинди. Ажратиб олинган ДНК -20 ҳароратда сақланди. Бактерия ДНКсидаги те-гишли VacA, IceA генларга мос праймерлар тан-ланиб, ПЗР-амплификатори (Applied Biosystems

9700) ёрдамида кўпайтириб олинди (1-жадвал).

ПЗР-амплификация учун “GenPak^R PCR Core” (“ИзоГен лабораторияси”, Россия) реагентлар тўпламидан фойдаланилди. ПЗР-амплификацияси қуйидаги дастур орқали амалга оширилди: денатурациягача 3 дақиқа 95 ҳароратда ушлаб турилди; денатурация 95 °C – 1 дақиқа, ренатурация 58 °C – 1 дақиқа, (IceA- гени учун ренатурация температураси 55 °C) элонгация 72 °C – 1 дақиқа мобайнида 38 циклда такрорланди. Дастур элонгация босқичида 72 ҳароратда 5 дақиқа давом этиб, тугатилди. Олинган ПЗР маҳсулотини 2 фоизли агороза гелида 90 дақиқа давомида 120 V электр кучланиш таъсирида электрофорез қилинди. WiseDoc (Korea) транслюминаторида ПЗР маҳсулоти тасвирга олинди.

Олинган натижалар ва уларнинг муҳокама-маси: Жами 135 та ошқозон ичак касалликларига чалинган касалларнинг ошқозон биопсия намуналари йиғилди. Биопсия намуналари Наманган ҳудудидан 22 та, Тошкент ҳудудидан 107 та ва 6 та Фарғона ҳудудидан олинган. Биопсия намуналаридан *H. pylori* бактерияси VacA, IceA генлари бўйича генотипланди.

VacA, IceA генлари полимераза занжир реакциясида аниқландилди. VacA гени s1 типи 259 жуфт нуклеотид, s2 типи 286 жуфт нуклеотид, m1 570 жуфт нуклеотид, m2 645 жуфт нуклеотидни, IceA1 247, IceA2 229 ёки 334 жуфт нуклеотидни намоён қилди.

Тошкент вилояти ҳудуди бўйича 107 тадан VacA s1 61 та (57%), s2 27 та (25,2%), m1 36 (33,6%), m2 50 та (46,7%), IceA1 53 та (49,5%), IceA2 9 та (8,4%), s1/m1 комбинацияси 24 (22,4%) та, s1/m2 38 (35,5%) та, s2/m1 11 та (10,3%), s2/m2 15 та (14%), IceA1/IceA2 18 та (16,8%) ни ташкил қилди. Наманган вилояти бўйича 22 тадан VacA s1 17 та (77,3%), s2 2 та (9,1%), m1 6 та (27,2%), m2 14 та (63,6%), IceA1

19 та (86,36%), IceA2 1 та (4,54%), s1/m1 6 та (27,2%), s1/m2 10 та (45,4%), s2/m2 1 та (4,45%), IceA1/IceA2 2 та (9,09%) ни ташкил қилди.

Тошкент, Наманган ва Фарғона бўйича умумий олинган касалликлар бўйича кўриб чиқадиган бўлсак, ошқозон ракига учраган беморларда VacA s1 14 та, s2 3 та, m1 11 та, m2 6 та, s1/m1 ассоциацияси 8 та, s2/m1 2 та, s2/m2 топилмади. IceA1 18 та, IceA2 2та, IceA1/IceA2 комбинацияси топилмади. Гастрит касаллигида VacA типлари s1 28 та, s2 12 та, m1 17 та, m2 20 та, IceA1 25 та, IceA2 3та, s1/m1 ассоциацияси 14, s2/m1 6 та, s1/m2 13 та, s2/m2 5 та, IceA1/IceA2 10 та эканлиги аниқланди.

Ўн икки бармоқли ичак яраси касаллигида VacA s1 18 та, s2 6 та, m1 4 та, m2 20 та, s1/m1 2 та, s2/m1 3 та, s1/m2 15 та, s2/m2 3 та, IceA1 20 та, IceA2 1 та, IceA1/IceA2 4 та аниқланди.

Носпецифик ярали колит (НЯК) да VacA s1 18 та, s2 8 та, m1 7 та, m2 19 та, IceA1 9 та, IceA2 3 та, s1/m1 7 та, s1/m2 14 та, s2/m1 1та, s2/m2 8 та, IceA1/IceA2 6 тани ташкил қилди (2-жадвал).

VacAs1/m1 комбинацияси жами 26 та шундан; ошқозон ракида 8 та, гастритда 8 та, MALT-лимфомада 1та, ўн икки бармоқли ичак ярасида 2 та, носпецифик ярали колитда 7 та. VacAs1/m2 комбинацияси жами 43 та шундан; ошқозон ракида 6 та, гастритда 9 та, ўн икки бармоқли ичак ярасида 15 та, носпецифик ярали колитда 12 та. VacAs2/m1 комбинацияси жами 12 та шундан; ошқозон ракида 2 та, гастритда 5 та, ошқозон ярасида 3 та, ошқозон полипида 1 та, носпецифик ярали колитда 1 та. VacAs2/m2 комбинацияси жами 10 та шундан; гастритда 4 та, ўн икки бармоқли ичак ярасида 2 та, носпецифик ярали колитда 4 та эканлиги аниқланди.

Финляндияда сурункали гастрит ва ўн икки бармоқли ичак яраси касаллиги VacA, гени генотипланганда s1/m2 сурункали гастритда (63,3%), ўн икки бармоқли ичак ярасида (68,7%) продо-

1-жадвал. VacA, IceA генларига праймерлар ва ПЗР маҳсулотининг ўлчамлари

Генлар	Праймерлар	Праймерларнинг нуклеотидлар кетма-кетлиги (5→3)	ПЗР- маҳсулотини ўлчами (жуфт нуклеотид)
VacA s1/s2	VA1-F VA1-R	ATGGAAATACAACAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	S1- 259, s2-286
VacA m1/ m2	VAG-F VAG-R	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG GCGTCTAAATAATTCCAAGG	m1-570, m2- 645
iceA1	iceA1F iceA1R	GTGTTTTTAACCAAAGTATC CTATAGCCASTYTCTTTGCA	247
iceA2	iceA2F iceA2R	GTTGGGTATATCACAATTTAT TTRCCCTATTTTCTAGTAGGT	229 ёки 334

2-жадвал. Ошқозон ва ўн икки бармоқли ичак касалликларида *H. Pylori* VacA, IceA генлари бўйича генотиплангани (Тошкент, Наманган, Фарғона ҳудудлари бўйича)

Касалликлар	VacA ⁺	IceA1 ⁺	IceA2 ⁺	IceA1 ⁺ / IceA2 ⁺							
	s1	s2	m1	m2	s1/ m1	s2/ m1	s1/ m2	s2/ m2			
Ошқозон раки	14	3	11	6	8	2	6	-	18	2	-
MALT-лимфома	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-
Гастрит	28	12	17	20	14	6	13	5	25	3	10
Ошқозон яраси	1	-	2	1	-	-	1	-	2	-	-
ЎБИ яраси	18	6	4	20	2	3	15	3	20	1	4
Ошқозон полипи	-	1	1	-	-	1	-	-	-	1	-
Жигар циррози	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
НЯК	18	8	7	19	7	1	14	8	9	3	6
ЖАМИ: 135	80	30	43	66	32	13	49	16	75	10	20

минант ҳолатда топилган. Сурункали гастритда IceA2, ўн икки бармоқли ичак ярасида IceA1 кўп учраган бўлса, умуман s1 (89,1%), m2 (82,6 %) бошқа типларган қараганда кўп учраган [13]. Иорданияда гастрит касаллиги билан s1, m1, IceA2 боғланган [14].

Колумбияда ўн икки бармоқли ичак ярасида s1/IceA1, гастрит ва ошқозон ракида s1/IceA2 аллеллари, АҚШда гастрит, ошқозон раки ва ўн икки бармоқли ичак яраси касалликларида s1/IceA2 бошқа аллелларга нисбатан кўп учраган. Корея ва Японияда гастрит, ошқозон раки ва ўн икки бармоқли ичак яраси касалликларида s1/IceA1 кўп учраган [8]. Болгарияда IceA1, s1, m1 [9]. Кореяда s1c, m1 кўп учраган [11]. Тайванда сурункали гастрит, ошқозон ярасида ва ўн икки бармоқли ичак ярасида s1a, s1c, m2, iceA1 кўп учраган бўлса, ошқозон яраси ва сурункали гастритда s2 умуман учрамаган [15].

Олинган натижалардан маълум бўлдики, ошқозон ракида VacAs1, VacAm1, IceA1 продоминант ҳолда эканлиги аниқланди. Гастритда VacA s1, VacA m1, VacA m2, IceA1, ўн икки бармоқли ичак ярасида ва носпецифик ярали колитда VacA s1, VacA m2, IceA1 продоминант ҳолда шунингдек, ошқозон ракида VacAs1/m1 комбинацияси гастрит, ўн икки бармоқли ичак яраси ҳамда носпецифик ярали колитда VacAs1/m2 комбинацияси кўп учраши аниқланди.

Ўтказилган тадқиқот натижаларига асосланиб *H.pylori* вирулент генларининг учраши гастрит-энтерологик касалликлар, экологик омиллар, овқатланиш, турмуш тарзи билан узвий боғлиқлигини ҳулоса ўрнида келтириш мумкин. Шу сабабли, дунёнинг ҳар бир минтақаси аҳолисида учровчи бактерия генотиби ҳамда гастралозентерогик касалликлар билан боғлиқлигини ўрганиш муҳим илмий- амалий аҳамият касб этади.

Фойдаланилган адабиётлар:

1. Turdikulova Sh., Bronovickiy E., Mukhamedov R. Genotyping of *Helicobacter pylori* from biopsies for *Cag A*, *Vac A* and *Ice A* genes // *Uzbek Biology Journal*, 2008. 14, P.53-56
2. Turdikulova Sh., Ibragimov Kh., Urzaliyev B., Mukhamedov R. Study the genes of virulency gastric pathogene *Helicobacter pylori* in Aral Sea region of Uzbekistan // *Problems of biology and medicine*. 2010. №6. P. 157-162.
3. Turdikulova Sh., Ibragimov H. Prevalence of VacA and CagA genotypes of *Helicobacter pylori* in Uzbekistan and association with gastric cancer. 9th International Congress of Gastric Cancer. Seoul. 2011.
4. Suerbaum S., P. Michetti. *Helicobacter pylori* infection // *N. Engl. J. Med*. 2002. 347: P. 1175–1186.
5. Shiho Yamazaki, Akiyo Yamakawa, Tomoyuki Okuda, Masahiro Ohtani, Hiroyuki Suto, Yoshiyuki Ito, Yukinao Yamazaki, Yoshihide Keida, Hideaki Higashi, Masanori Hatakeyama, and Takeshi Azuma. Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan // *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 2005, Vol. 43, No. 8. P. 3906–3916.
6. Guruge J.L., Falk P.G., Lorens R.G., Dans M., With H.P., Blaser M.J., Berg D.E., Peek R.M.J., Thompson S.A., Donahue J.P., Tham K.T., Atherton J.C., Blaser M.J., Miller G.G. Adherence to gastric epithelial cells induce expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iseA*, that is associated with clinical outcome // *Proc. Assoc. Am. Physicians*. 1998, Nov-

Dec; 110(b): P. 531-44.

7. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, et al. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* 2002. 517 (1-3): P. 180–184.

8. Yoshio Yamaoka, Tadashi Kodama, Oscar Gutierrez, Jong G. Kim, Kei Kashima, David Y. Graham. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* // *Journal Of Clinical Microbiology*, 1999 July. P. 2274–2279.

9. Lyudmila Boyanova. Daniel Yordanov Galina Gergova. Romyana Markovska Ivan Mitov. Association of *iceA* and *babA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010. 98: P. 343–350.

10. Yoshio Yamaoka, Etsuro Oritob, Masashi Mizokami, Oscar Gutierrez, Naruya Saitou, Tadashi Kodama, Michael S. Osato, Jong G. Kim, Francisco C. Ramirez, Varocha Mahachai, David Y. Graham. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus // *FEBS Letters* 2002. 517. P. 180-184.

11. Yon Ho Choe, Pum Soo Kim, Don Haeng Lee, Hyung Kil Kim, Young Soo Kim, Yong Woon Shin, Tae Sook Hwang, Hyeon Joo Kim, Sun Uk Song, Mi Sook Choi. Diverse *VacA* Allelic Types of *Helicobacter pylori* in Korea and Clinical Correlation // *Yonsei Medical Journal*. 2002. Vol. 43, No. 3. P. 351 – 356.

12. Guo-Chao Wei, Jing Chen, Ai-Yun Liu, Miao Zhang, Xiao-Jun Liu, Dan Liu, Jun Xu, Bing-Rong Liu, Hong Ling, Hua-Xing Wu, Ya-Ju Du. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes and correlation with clinical outcome // *Experimental And Therapeutic Medicine* 2012. 4: P. 1039-1044.

13. Vildan Caner, Mustafa Yilmaz, Nadir Yonecti, Sevil Zencir, Nedim Karagenc, Ilknur Kaleli, Huseyin Bagci // *H pylori iceA* alleles are disease-specific virulence factors // *World J Gastroenterology*. 2007 May 14; 13 (18): P. 2581-2585.

14. Nimri L., Bani-hani K.E, Matalka I, Ibrahim M. Clinical Relevance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* Genotypes of *Helicobacter pylori* // *Webmedcentral Microbiology*. 2011 Nov; № 2; P. 11.

15. Hwai-Jeng Lin, Chin-Lin Perng, Wen-Ching Lo, Chew-Wun Wu, Guan-Ying Tseng, Anna Fen-Yau Li, I-Chen Sun, Yueh-Hsing Ou. *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *vacA* genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan // *World J Gastroenterol* 2004; 10 (17): P. 2493-2497.