

Молекулярно-Генетическое Исследование Helicobacter Pylori У Ревматологических Больных

Тухтаева Н.Х., Мусаев Х.Н., Азимова М.М.

Аннотация

Приведен обзор молекулярно-генетического исследования для диагностики генотипических особенностей Helicobacter pylori в формировании НПВС гастропатии у ревматологических больных позволяющий практикующему врачу провести интерпретацию полученных результатов и правильную эррадикационную терапию.

Ключевые слова: Helicobacter pylori, диагностика.

Ташкентская Медицинская Академия, Ташкентский Университет прикладных наук

Постоянные исследования в разработке как инвазивных, так и неинвазивных методов диагностики инфекции *H. pylori* будут в значительной степени способствовать дальнейшему улучшению лечения заболеваний, связанных с этим микроорганизмом. Не смотря на то что бактерия *H. pylori* была единодушно объявлена патогеном человека, лишь у небольшой части инфицированных людей развивается ассоциированное заболевание, которое, по-видимому, в основном связано с наличием факторов вирулентности *H. pylori*. На основе исследований который проводятся на сегодняшний день лежит индивидуальная идентификация факторов вирулентности бактерии для стратификации риска развития той или иной патологии, обсуждается вопрос и оценка риска в сочетании с гистопатологической оценкой гастрита.

Существуют общепринятые методы диагностики для выявления инфекции *H. pylori*. и проверки факторов вирулентности. Тем не менее, хотя методы золотого стандарта по-прежнему в основном основаны на методах биопсии, высокая распространенность инфекции, особенно в районах с низким уровнем медицинского обслуживания, предполагает срочную необходимость внедрения неинвазивных и, предпочтительно, недорого стоящих методов диагностики с высокой пропускной способностью. Выбор такого метода диагностики зависит от чувствительности, специфичности, доступности, сложности, стоимости и скорости получения результатов [1]. К сожалению, ни один из используемых в настоящее время методов полностью не удовлетворяет эти критерии. Хотя методы, основанные на биопсии, обладают очень высокой специфичностью, они обладают

относительно низкой чувствительность, в основном из-за факторов, которые трудно контролировать, таких как место отбора биоптата. Даже несмотря на соблюдения всех правил для правильного отбора образцов, существуют другие факторы, такие как употребление лекарственных препаратов непосредственно до исследования, которые могут повлиять на рост или присутствие обнаруживаемых *H. pylori*.

Диагностический метод на основе ПЦР имеет небольшое преимущество по сравнению с другими методами [2,3]. ПЦР, как высокочувствительный и специфический метод, применим не только для выявления инфекции *H. pylori*, но и для мониторинга эффективности лечения и терапии. Проведенные исследования показали, что при правильном проектировании ПЦР одной копии геномной ДНК достаточно для получения положительного результата, указывающего на присутствие *H. pylori* в образце. Более того, образцы ДНК, выделенные из различных источников, таких как биопсия желудка, образцы из ротовой полости и образцы стула, могут быть подвергнуты анализу ПЦР. Соответственно, исключая возможные шансы контаминации, ПЦР может использоваться как золотой стандарт. Основным недостатком ПЦР, является уровень диагностической клиники и внедрение этого метода в регионах с плохим медицинским обеспечением.

Поскольку другие методы, основанные на биопсии, имеют ряд специфичных методу недостатки, такие как необходимость оснащенности эндоскопическим оборудованием или дополнительными системами для экспресс теста с уреазой, они не совсем подходят в качестве золотых стандартов. В последнее время большинство усилий по внедрению адекватного золотого стандарта сосредоточено на неинвазивных методах.

Помимо ПЦР, были значительно усовершенствованы серологические методы, направленные на обнаружение специфических антигенов *H. pylori* в различных образцах. Биоинформационный анализ помогает в выборе оптимального антигена, применяемого в серологических анализах. Благодаря выбору подходящего антигена и применению передовых методов нанотехнологии при разработке тестов новые серологические тесты недавно достигли относительно идеальных результатов [1]. Благодаря серологическому исследованию определены антигены во всех штаммах *H. pylori*, которые обладают не только высокой иммуногенностью, но также вызывают специфические антитела, которые исчезают через относительно короткое время. Усовершенствованные и упрощенные методы обнаружения специфических антител, такие как линейный анализ и экспресс-тесты, значительно улучшили применение серологических тестов для обнаружения *H. pylori*. Эти подходы охватывают большинство критериев, упомянутых для диагностических тестов *H. pylori*. Они не только применимы в высокопроизводительных исследованиях больших когорт, но также очень экономичны, просты для анализа и понятны для медицинского персонала.

Необходимо отметить что есть очевидные доказательства того, что не каждый штамм *H. pylori* вреден и требует лечения [4, 5]. Кроме того, накапливаются данные о положительных аспектах заражения *H. pylori* для человека-хозяина [6]. Поэтому настоятельно рекомендуется проведение стратификации риска по эпидемиологическим данным. Возможность таких оценок в настоящее время возможна исключительно с помощью серологических анализов, которые могут указывать на инфекцию патогенными штаммами *H. pylori*.

На сегодняшний день были проведены многочисленные исследования по изучению влияния молекулярного и генетического состава *H. pylori* и его патогенных факторов на клиническое течение гастродуоденальных заболеваний. В настоящее время большое внимание уделяется изучению генотипа *H. pylori*, вызывающего рак желудка, гастрит и гастродуоденальные язвы. Ряд исследователей показали связь между генами *H. pylori* и развитием язвенной болезни желудка, к таким генам относятся *cagA*, *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs1c*, *vacAs2*, *babA*, *iceA1*, *iceA2* и *dupA* [3]. В целом, вторым по важности фактором ультраогенеза при инфекции

Helicobacter pylori является использование нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС), но влияние патогенных факторов *H. pylori* на эрозию и вызванную НПВС слизистую оболочку желудка и кишечника изучено недостаточно. Результаты работ по изучению влияний генов *H. pylori* *cagA*, *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs1c*, *vacAs2*, *babA*, *iceA1*, *iceA2* и *dupA* на вероятность развития гастропатии, вызванной НПВС, у пациентов с ревматоидным артритом (РА) показали что перечисленные гены *H. pylori* могут быть рассмотрены как дополнительные факторы риска НПВС-гастропатии [3].

К аналогичным заключениям пришли ряд других исследователей. Так например, генетический анализ *H. pylori* в Восточной Азии и Южной Америке показал, что наличие гена *dupA* создает риск язвы двенадцатиперстной кишки и снижает риск атрофии слизистой оболочки желудка, кишечной метаплазии и рака желудка. При гастрите ген *dupA* был обнаружен у 21% обследованных, а у больных с язвой двенадцатиперстной кишки - в 42% случаев [5]. В Бразилии ген *H. pylori* был обнаружен у 41,5% *dupA* и *cagA* у 47,8% пациентов с симптомами диспепсии, в некоторых случаях наблюдалась комбинация генов *dupA*, *cagA* и генотипа *vacAs1/m1*, что, по мнению авторов, связано с желудочно-кишечным заболеванием [7].

Бразильские исследователи в свою очередь отметили что в ходе исследования часто встречали гены *iceA2* и *cagA* *H. pylori* у пациентов с язвенной болезнью, а наличие гена *babA2* *H. pylori* не приводило к гастродуоденальной болезни [8]. Y.H. Chang и соавт. показали, что генотип *vacAm2* + *H. pylori* связан с развитием гастродуоденальных язв [5].

В другом исследовании в Республике Беларусь частота выявления гена *cagA* *H. pylori* у больных раком желудка составила 68,2%, у больных гастритом - 61,6%, язвенной болезнью - 72,7%, язвой двенадцати перстной кишки - 87,5%, а в контрольной группе - 55,6% [9,14].

Использование *H. pylori* и НПВС является независимым фактором риска эрозивно-язвенного развития слизистой оболочки гастродуоденальной зоны [10]. Существуют отдельные исследования влияния молекулярного и генетического состава *H. pylori* на развитие гастродуоденальной патологии при длительном применении НПВС. В ряде исследований было показано, что *CagA*-положительные штаммы *H. pylori* удваивают частоту кровотечений при приеме НПВС [5]. Их данные подтвердили другие исследователи, отметив, что присутствие штаммов *cagA* и *H. pylori* увеличивает частоту желудочно-кишечных и двенадцатиперстных кровотечений у людей, принимающих низкие дозы аспирина [10,13]. Гастро- и дуоденопатия, ассоциированная с приемом нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) и инфекция *H. pylori* рассматриваются на сегодняшний момент как два независимых патогенетических фактора заболеваний желудочно-кишечного тракта, способных потенцировать друг друга. Вот почему так важно провести своевременную диагностику *H. pylori*, для правильного выбора дальнейшей тактики лечения.

Диагностики генетических факторов риска развития НПВС-гастропатии у больных с ревматоидным артритом инфицированных *H. Pylori* проводится для определения воздействия *cagA*, *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs1c*, *vacAs2*, *babA*, *iceA1*, *iceA2* и *dupA* генов *H. pylori* на возможность появления гастропатии, индуцированной длительным использованием НПВС (НПВС-гастропатии).

Для выявления наличия генов диагностика проводится в двух этапах, первый выделение и идентификация, второй этап подготовка геномной ДНК и анализ ПЦР. На первом этапе необходимо эндоскопически получить три биоптата в области большой кривизны антрального отдела желудка, два из которых используется для гистологического исследования, а один - для культивирования *H. pylori*. Образцы биопсии желудка для культивирования хранятся в транспортной среде, состоящей из тиогликолата с 1,3 г/л агара, с 3% дрожжевым экстрактом, и обязательно доставляются в лабораторию в тот же день.

Далее проводится второй этап, подготовка геномной ДНК и анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК из каждого изолята *H. pylori* экстрагируется с использованием специального набора. Генотипы s-области *vacA* (s1 или s2) и m-области (m1 или m2), наличие генов *cagA*, *cagE*, *oipA*, *iceA* и *babA2* определяются с использованием специфических праймеров. Генотип *cagA*; Восточноазиатский тип (тип 1a) или западный тип (тип 2a) также определяются с помощью ПЦР, как описано ранее [11,12].

Ген *glmM* (*ureC*) используется в качестве контроля для обнаружения ДНК *H. pylori*. Все исследуемые смеси для ПЦР готовятся в объеме 25 мл, содержащем 1 буфер для ПЦР, 500 нМ каждого праймера, 1,5 мМ $MgCl_2$; 200 мМ каждого dNTP, 1,5U Taq ДНК-полимеразы и 300 нг образца ДНК. Смеси помещаются в термоциклер, продукты ПЦР визуализируются электрофорезом в 1,5% агарозном геле, окрашиваются бромидом этидия и исследуются при УФ-освещении. Смешанная инфекция разных генотипов и образцы, отрицательные по вакцине *vacA*, по протоколу исключаются из анализа.

Для проведения молекулярной диагностики, перед началом эрадикационной терапии берется биоптат из антрального отдела желудка во время эндоскопии желудка. При контроле исцеления взятие биопсийного материала производится по истечению 4 недели впоследствии завершения курса антихеликобактерной терапии из тела желудка. Биоптат помещают в стерильную сухую пробирку (эппендорф) и незамедлительно доставляется в лабораторию. Вероятна заморозка взятого биопсийного материала при температуре $-200^{\circ}C$ для больше долговременного сбережения. При наличии у больных гастродуоденальной патологии в сочетании с гингивитом, парадонтозом вполне вероятно изучение биопсийного материала из десен, мазка зубного налета, слюны. Полученные образцы ткани помещаются в стерильную сухую пробирку и доставляется в лабораторию для проведения ПЦР диагностики. Обнаружение *H. pylori* в образцах кала с использованием метода ПЦР диагностики продемонстрировало высокие цифры чувствительности и специфичности - 83,8% и 98,4% соответственно [1,15]. Ложноположительные итоги у пролеченных больных возможно приписать персистенцией в организме кокковых форм *H. pylori*, которые, как правило начинают понижаться и всецело пропадают на 8-12 неделе. В целом, молекулярный способ разрешает обнаруживать, дифференцировать штаммы бактерии *H. pylori*, например *CagA* и *VacA*. ПЦР выявляет своеобразные мутации, которые приводят к стойкости к лекарствам, собственно что разрешает до начала терапии обнаружить резистентность к макролидам и фторхинолонам. Способ разрешает показывать бактерия в всякий форме, в что количестве и кокковой. Праймер для ПЦР получают из нуклеотидной очередности гена уреазы А или же В *H. pylori*. Эти праймеры специфичны для всех штаммов *H. pylori* и не обнаруживаются в иных обликах микробов, собственно что готовит ПЦР высокоспецифичным способом. Не считая такого, ПЦР - это более восприимчивый способ по сопоставлению с другими способами диагностики *H. pylori* -инфекции и разрешает выявить в том числе и 1,47 pg ДНК. Аффектация и специфика сего способа оформляют в соответствии с этим 95% и 100% [5,16].

Основными недостатками ПЦР являются то, что методика дорогая и требует больших навыков и опыта. Также ложноположительные результаты могут быть обнаружены в ПЦР из-за обнаружения фрагментов ДНК уже мертвых бактерий [5,11]. Недостатком также является возможность загрязнения образцов, но это можно избежать, используя стандарты биобезопасности на всех этапах процесса. Также следует учитывать, что после антибактериальной терапии количество бактерий уменьшается, а микробиологические и гистологические тесты могут давать ложноотрицательные результаты. Однако ПЦР - чувствительный метод, позволяющий амплифицировать даже небольшое количество бактериальной ДНК в различных типах биологических образцов [12,17].

Необходимо помнить что для выявления *Helicobacter pylori* наиболее достоверным является метод ПЦР-диагностики, помимо раскрытия молекулярного и генетического состава, создает среду для дальнейшего изучения и прогнозирования болезни.

Литература.

1. Kh, T. N., Sh, K. M., & Kurbanov, A. K. (2021). Assessment of the gastrointestinal tract in patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2(5), 34-37.
2. Kh, T. N., Sh, K. M., & Sibirkina, M. V. (2022). Genotypical Features of Helicobacter Pylori in the Formation of Nsaid Gastropathies in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Eurasian Medical Research Periodical*, 8, 94-97.
3. Khasanova, G. H., Tukhtaeva, N. K., Saidov, V. M., & Zhulkevych, I. V. (2019). Modern approaches to dietotherapy in hypertensive disease. *Вісник наукових досліджень*, (1), 11-14.
4. Nurmetov, Kh. T., Marufkhanov, Kh. M., Talipov, R. M., & Tukhtaeva, N. Kh. (2023). Clinical and epidemiological features of ankylosing spondylarthritis in a hospital setting.
5. Nurmetov, Kh. T., Marufkhanov, Kh. M., Talipov, R. M., Tukhtaeva N. Kh. (2023). Clinical and epidemiological features of ankylosing spondylitis in a hospital setting
6. Tukhtaeva, N. K. (2023). The degree of damage to the gastroduodenal zone in patients with rheumatoid arthritis against the background of basic and anti-inflammatory therapy. *Texas Journal of Medical Science*, 25, 58-62.
7. Tukhtaeva, N. K., & Karimov, M. S. (2023). Features of helicobacter pylori genes in NSAID gastropathy in patients with rheumatoid arthritis.
8. Tukhtayeva, N. K., Karimov, M. S., & Azadaeva, K. E. (2023). Articular syndrome in the practice of a rheumatologist.
9. Азадаева, К. Э., Тухтаева, Н. Х., & Каримов, М. Ш. (2023). Характеристика липидного профиля крови у больных реактивным артритом при нарушении микробиоценоза гастродуоденальной зоны и пути его коррекции.
10. Каримов, М. Ш., Тухтаева, Н. Х., & Сибиркина, М. В. (2020). Некоторые показатели фармакокинетики диклофенака натрия у больных ревматоидным артритом с учетом коморбидных состояний: научное издание. *Терапевтический вестник Узбекистана/научно-практический журнал: ЗАО СЕАЛ МАГ*, (2), 120-125.
11. Мавлянов, И. Р., & Мавлянов, С. И. (2019). Типы нервной системы и его взаимосвязь с комплаентностью больных к проводимой терапии. In *Безопасный спорт-2019* (pp. 74-76).
12. Мавлянов, И. Р., Даминова, Л. Т., & Акмалова, Э. М. (2011). Динамика артериального давления у больных гипертонической болезнью на фоне терапии препаратами амлодипина Норваск и Короним по данным суточного мониторирования. *Артериальная гипертензия*, 17(2), 146-150.
13. Мавлянов, И. Р., Мустафин, Р. И., & Тухтаева, Н. Х. (2012). Характеристика просветной и пристеночной микрофлоры желудка больных с ревматоидными и реактивными артритами. *Вестник новых медицинских технологий*, 19(2), 319-322.
14. Мирзаханова, М. И., & Каримов, М. Ш. (2006). Проблемы ранней диагностики и лечения ревматоидного артрита. Методическое руководство. *Методическое руководство. Ташкент*, 5-8.
15. Нурметов, Х. Т., Маруфханов, Х. М., Талипов, Р. М., & Тухтаева, Н. Х. (2023). Клинико-эпидемиологические особенности анкилозирующего спондилартрита в условиях стационара.
16. Парпиева, Д. А., Шукурова, Ф. Н., & Каримов, М. Ш. (2020). Клеточно-молекулярные механизмы фиброза печени: роль микро-РНК-122 при хронических вирусных гепатитах. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, (8 (180)), 50-53.
17. Тухтаева, Н. Х., Каримов, М. Ш., & Сибиркина, М. В. (2020). Изучение обсемененности *H. pylori* у больных ревматоидным артритом.