

ных денатурирующих факторов на молекулу белка возможно разрушение нескольких дисульфидных связей из семнадцати существующих в ней. После чего к одной молекуле альбумина может присоединиться другая белковая молекула, имеющая в своем составе такую же восстановленную группу цистеина. Таким образом, воздействие мочевины может привести к формированию крупных белковых комплексов, которые включают десятки молекул альбумина.

Возможно, что каждый из представленных гипотетических процессов может иметь место в данном эксперименте. При этом при разных концентрациях мочевины значение каждого из этих факторов будет изменяться. Так, известно, что образование олигомеров белка за счет дисульфидных связей происходит только при высоких концентрациях мочевины, а при ее низких значениях олигомерные фракции белка образуются в основном за счет гидрофобных взаимодействий.

Данные олигомерные комплексы белка проявляют совершенно иные флуоресцентные свойства, чем мономерная фракция белка. Так, находящиеся внутри белкового комплекса молекулы получают меньшее количество энергии, возбуждающей флуоресценцию, из-за эффекта экранирования со стороны молекул, находящихся на поверхности белкового комплекса. Также та энергия, которая все же дошла до триптофанов молекул, находящихся внутри белкового комплекса, может теряться безизлучательно, так как внутри такого белкового комплекса высока вероятность столкновения возбужденной аминокислоты с аминокислотой, которая имеет низкий запас энергии, и таким образом, значительная часть поглощенной энергии рассеивается внутри белкового комплекса.

В результате влияния этих факторов изменение интенсивности флуоресценции альбумина не всегда может однозначно указывать на тот или иной процесс, который происходит с молекулой альбумина. Для повышения эффективности спектрофлуориметрического метода применяют метод добавления в исследуемый раствор флуоресцентного зонда. Флуоресцентные зонды — это молекулы, способные флуоресцировать, связавшись с молекулой исследуемого вещества,

при этом интенсивность флуоресценции исследуемого образца увеличивается в несколько раз. Это происходит благодаря тому, что практически вся энергия, поглощенная триптофанами, мигрирует на флуоресцентный зонд. Чем больше молекул флуоресцентного зонда связывается с молекулой, тем выше интенсивность зондовой флуоресценции и ниже флуоресценция остатков триптофана. Флуоресцентные зонды в отличие от флуоресцентных меток взаимодействуют с молекулами благодаря нековалентным взаимодействиям, поэтому их прикрепление к молекуле белка практически не сказывается на пространственной укладке белковой молекулы.

#### **Заключение**

Таким образом, экспериментально показано, что молекула сывороточного альбумина обладает очень лабильной и неустойчивой структурой. Незначительные изменения величины pH или концентрации мочевины вызывало значительные конформационные перестройки в белковой глобуле. Можно с определенной долей достоверности предположить, что возрастание концентрации мочевины в крови будет способствовать разрушению нативной конформации сывороточного альбумина, что вносит определенный вклад в протекание патологического процесса.

По снижению показателя интенсивности зондовой флуоресценции можно судить о том, что с ростом концентрации мочевины связывающая способность альбумина снижается. Таким образом и в организме может проявляться данная закономерность, из-за чего большие концентрации мочевины нарушают одну из основных — транспортную функцию альбумина.

#### **БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. — М.: ИРИУС, 1994. — 226 с.
2. Чёгер, С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина / С. И. Чёгер. — Бухарест: Изд-во Академии СРР, 1975. — 183 с.
3. Луйк, А. И. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов / А. И. Луйк, В. Д. Лукьянчук. — М.: Медицина, 1984. — С. 12–29.
4. Биохимия: учеб. / Под ред. Е. С. Северина. — 2-е изд., испр. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 784 с.
5. Мушкамбаров, Н. Н. Молекулярная биология: учеб. пособие для студ. мед. вузов / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. — М.: Медицинское информационное агентство, 2007. — 536 с.

Поступила 17.11.2010

УДК 616.98-078:579,835.12:575.22

### **РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ *HELICOBACTER PYLORI***

**А. В. Воропаева<sup>1</sup>, О. Ю. Баранов<sup>2</sup>, Е. В. Воропаев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр  
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель  
<sup>2</sup>Гомельский государственный медицинский университет

Разработана и апробирована методика определения генотипов и аллельных вариантов *Helicobacter pylori* с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющая определять генетическую структуру циркулирующих штаммов и их роль в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Достоверных разли-

чий между группами больных с заболеваниями ЖКТ и группой больных гастритами не выявлено ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует о близкой генетической структуре *H. pylori* в группах пациентов с заболеваниями ЖКТ. Достоверно чаще встречается *cagA*-генотип при сравнении показателей контрольной группы и группы пациентов с ЯБДК ( $p = 0,007$ ), что показывает значимость данного гена в развитии дуоденальных язв.

**Ключевые слова:** *H. pylori*, праймеры, ПЦР, генотип, заболевания желудка-кишечного тракта.

## PREPARATION AND APPROBATION OF HELICOBACTER PYLORI GENIC AND ALLELIC VARIANT TESTING

A. V. Voropaeva<sup>1</sup>, O. Yu. Baranov<sup>2</sup>, E. V. Voropaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel

<sup>2</sup>Gomel State Medical University

Prepared and approbated method of *H. pylori* genotype and allelic variant testing by means of PCR (polymerase chain reaction). PCR determines the genetic structure of *H. pylori* circulating strains and their role in the occurrence of GIT (gastrointestinal tract) diseases. There are no significant differences between the groups of patients with GIT diseases and gastritis ( $p > 0,05$ ). It testifies about the similar gene structure of *H. pylori* in the patients with GIT diseases. *CagA* genotype is significantly more often observed in making a comparison of control group and duodenal ulcer patients ( $p = 0,007$ ). It reveals the significance of this gene in the occurrence of duodenal ulcers.

**Key words:** *H. pylori*, clarithromycin, PCR-RFLP, genotype, resistance.

### Введение

Важнейшее значение, определяющее клинические исходы инфицирования человека *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), придается в настоящее время генетической структуре микроорганизма. С этой целью во всем мире проводятся масштабные исследования, позволяющие оценить региональные особенности генотипа *H. pylori*, так как развитие клинически значимого заболевания зависит в значительной степени от патогенного потенциала бактерии, а не только от восприимчивости макроорганизма и экологических факторов.

В геноме бактерии *H. pylori* имеются гены (*vacA*, *cagA*, *babA*, *iceA*, *dupA*), ассоциированные с повышенной патогенностью. Примерно 50 % штаммов *H. pylori* выделяют активный вакуолизирующий цитотоксин *VacA*, тогда как ген *vacA* содержится почти у всех штаммов. Ген *vacA* имеет 2 региона: сигнальный — s (signal) и срединный — m (middle). Сигнальный s-регион гена включает два подтипа — s1 и s2. Срединный m-регион имеет также два аллельных типа — m1 или m2 [1]. *VacA* цитотоксин повреждает мембраны клеток эпителия и формирует в них избирательный электроннозависимый канал ионов. Бикарбонат и органические анионы покидают клетку, что позволяет бактерии получать питание, *VacA* проникает в мембраны митохондрий, вследствие этого высвобождается цитохром C и начинается апоптоз. *VacA* в эксперименте вызывает эрозии и язвы слизистой желудка. Тем не менее примерно у 30 % пациентов с язвами цитотоксин не вырабатывается и, таким образом, существенно не влияет на ulcerogenesis [2].

Ген *cagA* (*cytotoxin associated gene*) имеет размер 128 kDa, кодирует белок длиной 1186 аминокислотных остатка и обязан своим именем первоначальной ассоциации с экспрессией

*vacA*-гена. *CagA*-ген считается маркером группы примерно 30 генов, т. н. *cag-PAI*-островка патогенности. Некоторые из них кодируют 4 тип секреторной системы, посредством которой протеин *CagA* может проникать в клетки эпителия [3]. Продукт *cagA*-гена вводится бактерией в эпителиальные клетки желудка, где затем проходит тирозинфосфорилирование. Фосфорилированный *CagA* специфически связывается SHP-2-фосфатазой, активирует ее деятельность и тем самым вызывает морфологические преобразования клеток. *CagA*-протеин обладает высокими антигенными свойствами, благодаря которым вырабатываются сывороточные *IgG*, *IgM*-антитела и местный *sIgA*-ответ [4, 5].

Ген *babA* (*blood group associated binding gene*) кодирует образование белка *BabA*, массой 75 kDa, который является посредником сцепления между Lewis b антигенами группы крови человека на клетках желудочного эпителия и *H. pylori*. *BabA* индуцирует продукцию интерлейкина IL-8, и его наличие связано с плотностью колонизации.

Ген *iceA* (*induced by contact with epithelium*) активируется при контакте с эпителиоцитами слизистой оболочки и существует в двух аллельных формах — *iceA1* и *iceA2*. У больных, инфицированных *H. pylori* с генотипом *iceA1*, инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки желудка полиморфно-ядерными нейтрофилами выше, чем у инфицированных другим генотипом. Адгезия к эпителиальным клеткам желудка *in vitro* индуцируется экспрессией *IceA1* белка. Имеются данные, указывающие на то, что аллель *iceA1* чаще встречается при язвенной болезни, *iceA2* — при гастритах [8].

В последнее время активно обсуждается роль нового фактора вирулентности — гена *dupA*

(*duodenal ulcer promoting*) как защитного маркера риска развития рака желудка и маркера язвенной болезни двенадцатиперстной кишки [10].

#### Цель

Разработать и апробировать методику, позволяющую проводить определение генотипов и аллельных вариантов *H. pylori* и соответственно оценить их клиническую значимость в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта в Республике Беларусь.

#### Материал и методы исследования

В исследовании использовались как известные последовательности праймеров, так и самостоятельно подобранные нами. Материалом для исследования являлись образцы биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ) пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта ( $n = 226$ ) и контрольной группы ( $n = 24$ ) с подтвержденной лабораторно при помощи быстрого уреазного теста и полимеразной цеп-

ной реакции (ПЦР) инфекцией *H. pylori*. Статистическая обработка выполнялась с использованием критерия  $\chi^2$ ,  $\chi^2$  с поправкой Йетса, построения и анализа ROC-кривых с помощью пакета программы «MedCalc», 9.6.2.0. Статистически достоверными считали данные при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Одной из хорошо изученных микробных детерминант, связанных с высоким риском развития заболеваний желудочно-кишечного тракта, является цитотоксинассоциированный ген *cagA* — иммунодоминантный антиген и маркер заболеваний. Учитывая важность выявления данного гена при хеликобактерассоциированных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, для этой цели нами изучены возможности применения различных пар праймеров, позволяющих выявлять данный ген, и отработаны условия проведения ПЦР. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Праймеры, используемые для выявления различных регионов *cagA* гена *H.pylori*

Сиквенс праймеров 5'-3'	Температура отжига, °C	Ссылка	Размер фрагмента
GATAACAGGCAAGCTTTTGAGGGA CTGCAAAAGATTGTTTGCCAGA	55	[11]	349 п.н.
TAACGCTGTCGCTTCATACG CCATTGGTACCTGTAGAAAC	55	Подобрана автором	867 п.н.
TGTTTGGGAAATGGATTGGT TTGCCCGCATACAATAATGA	52	Подобрана автором	712 п.н.
GGCAATGGTGGTCCTGGAGCTAGGC GGAAATCTTAAATCTCAGTTCGG	53	[11]	324 п.н.
GGAACCTAGTCGGTAATG TTTCAAAGGGAAAGGTCCGCC	53	[12]	501 п.н.
GGAACCTAGTCGGTAATG AGAGGGAAGCCTGCTTGATT	53	[12]	495 п.н.

В результате проведенного исследования было установлено, что фрагмент *cagA*-гена, характеризующий восточный тип (искомый фрагмент 501 п.н.), не был выявлен ни в одном из исследуемых образцов, несмотря на отработку условий амплификации. Данный факт свидетельствует о принадлежности циркулирующих в белорусском регионе штаммов *H. pylori* к западному типу. Так как *cagA*-ген является цитотоксинассоциированным и его присутствие определяет активность воспаления, нами проведена оценка соответствия выявленных *cagA*-генотипов и данных гистологического метода диагностики, а также сравнение чувствительности и специфичности 5 различных пар праймеров, используемых для выявления *cagA*-генотипа. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, положительные результаты выявления *cagA*-генотипа, полученные всеми праймерами, составили 7 случаев при малоактивной форме, 7 — при умеренноактивной и

17 — при высокоактивной, то есть 31 случай выявления. При проведении анализа любой положительный результат учитывали как истинно положительный. Поэтому ложноположительные результаты приняты за 0, соответственно, и специфичность всех вариантов ПЦР (используемых праймеров) составила 100 %. Исходя из данных предпосылок сравнивали чувствительность праймеров для выявления *CagA*-генотипа при помощи программы «MedCalc».

Максимальная чувствительность получена для праймеров с фрагментом амплификации 349 п.н. Следует отметить, что данная последовательность праймеров наиболее часто используется исследователями при изучении распространенности *cagA*-позитивных штаммов как среди западной, так и среди восточной популяции *H. pylori*, несмотря на достаточно высокий полиморфизм *cagA*-гена.

На рисунке 1 представлены ROC-кривые чувствительности 5 используемых пар праймеров.

Таблица 2 — Гистологические показатели СОЖ, связанные с *cagA*-генотипами *H. pylori* у пациентов с хроническим гастритом в зависимости от используемых праймеров

Степень гастрита / статистические показатели	Размер амплифицируемого фрагмента гена <i>cagA</i> (пар нуклеотидов)				
	349 п.н.	867 п.н.	712 п.н.	400 п.н.	495 п.н.
	Частота выявления искомого фрагмента гена <i>CagA</i>				
Малоактивный	7 (38,89 %) n = 18	2 (11,11 %) n = 18	1 (5,56 %) n = 18	5 (27,78 %) n = 18	5 (27,78 %) n = 18
Умеренноактивный	5 (45,45 %) n = 11	5 (45,45 %) n = 11	0 (0 %) n = 11	6 (54,55 %) n = 11	7 (63,64 %) n = 11
Высокоактивный	17 (73,91 %) n = 23	5 (21,74 %) n = 23	3 (13,04 %) n = 23	6 (26,09 %) n = 23	13 (56,52 %) n = 23
Всего	29 (55,7 %) n = 52	12 (23,07 %) n = 52	4 (7,69 %) n = 52	17 (32,69 %) n = 52	25 (48,07 %) n = 52
Чувствительность, %	93,55	38,71	12,9	54,84	80,65
95 % доверительный интервал	78,54–99,02	21,87–57,81	3,7–9,85	36,04–72,7	62,52–92,5
Достоверность различий	P1–2 < 0,001 P1–3 < 0,001* P1–4 = 0,003* P1–5 = 0,141	P2–4 = 0,343 P2–3 = 0,2	P3–5 < 0,001* P3–4 = 0,039*	P4–5 = 0,076	P2–5 = 0,008*

\* Различия достоверны (p < 0,05)

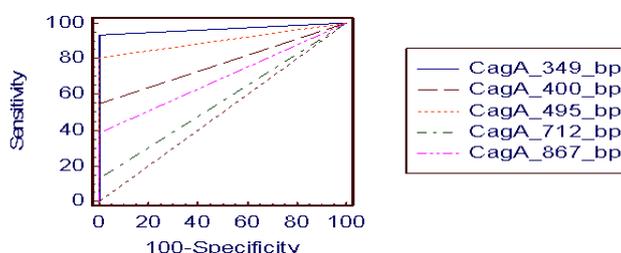


Рисунок 1 — ROC-кривые чувствительности используемых пар праймеров для выявления фрагмента *cagA*-гена *H. pylori*

При отработке условий проведения ПЦР по определению исследуемых нами генотипов и аллельных вариантов *H. pylori* использовали те же препараты ДНК, методику и принцип

подбора праймеров, что и при отработке условий амплификации *cagA*-генотипа. Подобранные праймеры для амплифицируемых регионов *H. pylori* представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Последовательности праймеров и режим амплификации для выявления генотипов и аллельных вариантов *H. pylori*

Амплифицируемый регион <i>H. pylori</i>	Сиквенс праймеров 5'–3'	Температура отжига, °C	Ссылка	Размер фрагмента
<i>cagA</i>	GATAACAGGCAAGCTTTTGGAG GGA CTG CAAAAGATTGTT TGGCAGA	55	[11]	349 п.н.
<i>vacAs</i> (s1 and s2)	ATGGAAATACAACAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAC	55	[1]	286 п.н.
<i>vacAmla</i>	GGTCAAAATGCGGTCATGG CCATTGGTACCTGTAGAAAC	55	[1]	290 п.н.
<i>vacAmlb</i>	GGCCCAATGCAGTCATGGAT GCTGTTAGTGCCTAAAGAAGCAT	57	[1]	291 п.н.
<i>vacAm2</i>	GGAGCCCCAGGAAAC ATTG CATAACTAGCGCCTTGCAC	58	[1]	352 п.н.
<i>vacAs1a</i>	GTCAGCATCACACCGCAAC ATGGAAATACAACAACACAC	50	[1]	190 п.н.
<i>vacAs1b</i>	GTCAGCATCACACCGCAAC ATGGAAATACAACAACACAC	50	[1]	187 п.н.
<i>vacAs1c</i>	CTYGCSTTAGTRGGGYTA ATGGAAATACAACAACACAC	50	[1]	213 п.н.
<i>iceA1</i>	GTGTTTTTAACCAAAGTATC STATAGCCASTYTCTTTGCA	43	[13]	247 п.н.
<i>iceA2</i>	GTTGGGTATATCACAATTTAT TTRCCSTATTTTCTAGTAGGT	46	[13]	229–334 п.н.
<i>babA2</i>	AATCCAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA TGTTAGTGATTTTCGGGTAGGACA	58	[14]	800 п.н.
<i>jhp 0917</i> (plasticity regions)	TGGTTTCTACTGACAGAGCTC AACACGCTGACAGGACAATCTCCC	50	[15]	307 п.н.
<i>jhp 0918</i> (plasticity regions)	CCTATATCGCTAACGCGCGCTC AAGCTGAAGCGTTTGTAAACG	55	[15]	276 п.н.

Для проведения ПЦР применялись однотипные условия амплификации, отличающиеся только температурой отжига, которая для каждой пары указана в таблице 1 и 3: 95 °С, 5 минут; 30 × (95 °С, 30 секунд; 55 °С, 30 секунд; 72 °С, 1 минута); 72° С, 1 минута.

Распределение генотипов и аллельных вариантов *H. pylori* — *cagA*, *vacAs* (*s1* and *s2*), *vacA m1a*, *vacAm1b*, *vacAs1a*, *vacA m2*, *vacAs1b*, *vacAs1c*, *bab A2*, *iceA1*, *iceA2*, *jhp 0917*, *jhp 0918* в исследуемой группе пациентов с ХГ (*n* = 52) представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Распределение генотипов и аллельных вариантов *H. pylori* в группе пациентов с диагнозом хронический гастрит

Субтипы <i>H. pylori</i>	Количество выявленных случаев	Частота, %
<i>cag A</i>	29	55,7
<i>vacAm</i>	—	—
<i>vacAm1a</i>	20	38,5
<i>vacAm1b</i>	5	9,6
<i>vacAm2</i>	23	44,2
<i>vacAs</i>	—	—
<i>vacAs1a</i>	23	44,2
<i>vacAs1b</i>	1	1,9
<i>vacAs1c</i>	0	0
<i>vacAs2</i>	23	44,2
<i>babA2</i>	1	1,9
<i>ice A1</i>	1	1,9
<i>ice A2</i>	2	3,8
<i>jHP 0917</i>	1	1,9
<i>jHP 0918</i>	0	0
<i>cag A + vacAm1/s1</i>	14	26,9
<i>cag A + vacAm1/s1 + ice A1 + babA2</i>	1	1,9
<i>cag A + vacAm1/s1 + ice A2</i>	2	3,8
<i>cag A + vacAm1/s1 + vacAm2 / vacAs1</i>	8	15,4
ИТОГО микст-штаммы	25	48,1

Проведенные нами исследования показали, что практически в половине случаев — 48,1 % среди пациентов с ХГ присутствуют микст-штаммы с несколькими патогенными генотипами, в том числе в 15,4 % микст-штаммы с различными аллельными вариантами вакуолизирующего цитотоксина *vacAm1 + vacAm2 / vacAs1 + vacAs2*.

Разработанная нами методика позволила провести оценку генотипического разнообразия *H. pylori* и роли микст-штаммов с различными аллельными вариантами в формировании патологии желудочно-кишечного тракта в выборочной группе пациентов с ЯБДК, ЯБЖ, НПВП-гастропатиями в сравнении с группой ХГ.

Результаты проведенного исследования представлены в таблице 5.

В результате данного исследования по большинству выявляемых генотипов определена сходная генетическая структура штаммов *H. pylori* при ЯБДК, ЯБЖ, НПВП-гастропатиях и ХГ, что может быть связано с региональными особенностями субтипов *H. pylori*. Тем не менее генотип *babA2*, *ice A1*, *ice A2* достоверно реже встречался в группе пациентов с ХГ

по сравнению с группами больных ЯБДК и НПВП-гастропатиями, генотипы *vacAm1*, *vacAm2*, *vacAs1*, *vacAm1s1 + vacAm2s2*, *ice A2* достоверно реже встречались в группе с гастритами по сравнению с группой с ЯБДК (*p* < 0,05). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что менее агрессивные штаммы способствуют развитию гастритов и не приводят к развитию язв.

Оценку значимости *cag A*-генотипа в формировании патологии ЖКТ в белорусском регионе проводили в группах пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (*n* = 226) в сравнении с контрольной группой (*n* = 24) и группой больных ХГ (*n* = 91) (таблица 6).

При анализе выявления *cag A*-генотипа *H. pylori* в контрольной и сравниваемых группах показано, что выявлены достоверные различия при сравнении контрольной группы и группы пациентов с ЯБДК (*p* = 0,007). *Cag A*-генотип *H. pylori* выявлен в 83 % исследуемых образцов. Проведенные нами исследования показывают значительный вклад цитотоксинассоциированного *cagA*-гена *H. pylori* в формирование ЯБДК в белорусском регионе.

Таблица 5 — Распределение генотипов *H. pylori* в группах обследованных пациентов с заболеваниями ЖКТ

Субтипы <i>H. pylori</i>	Группы обследованных								Достоверность различий	
	1. ЯБДК, n = 68		2. ЯЖ, n = 12		3. НПВП-гастропатии, n = 16		4. ХГ, n = 52		$\chi^2$	p
	n	%	n	%	n	%	n	%		
cagA	46	67,6	9	75	6	37,5	29	55,7	1,77 0,8 0,03	p1-4 = 0,18 p2-4 = 0,37 p3-4 = 0,85
babA2	30	44,1	3	25	3	18,8	1	1,9	25,2 3,59 5,36	p1-4 < 0,01* p2-4 = 0,58 p3-4 = 0,02*
vacAm1	46	67,6	10	83,3	6	37,5	25	48,1	4,67 3,57 0,21	p1-4 = 0,03* p2-4 = 0,06 p3-4 = 0,65
vacAm2	51	75	8	66,7	6	37,5	23	44,2	11,8 1,17 0,03	p1-4 = 0,0006* p2-4 = 0,27 p3-4 = 0,85
vacAs1	50	73,5	9	75	6	37,5	24	46,1	9,34 2,2 0,1	p1-4 = 0,002* p2-4 = 0,13 p3-4 = 0,74
vacAs2	37	54,4	7	58,3	6	37,5	23	44,2	1,22 0,32 0,03	p1-4 = 0,26 p2-4 = 0,57 p3-4 = 0,85
vacAm1s1+ vacAm2s2	22	32,4	4	33,3	4	25	8	15,4	4,52 1,05 0,26	p1-4 = 0,03* p2-4 = 0,3 p3-4 = 0,6
ice A1	10	14,7	0	0	6	75	1	1,9	5,78 13,1	p1-4 = 0,01* p3-4 = 0,0003*
ice A2	23	33,8	3	25	5	62,5	2	3,8	16,1 3,48 7,2	p1-4 = 0,0001* p2-4 = 0,06 p3-4 = 0,0073*
jHP0917+ jHP0918	5	7,35	1	8,3	0	0	0	0		

Поимечание. \* Различия достоверны (p < 0,05); n — количество обследованных пациентов в группе; n — количество обследованных пациентов с положительным субтипом.

Таблица 6 — Частота выявления cagA генотипа *H. pylori* среди пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта и контрольной группы

Группы (возрастной диапазон)	Выявлен cagA-генотип <i>H. pylori</i>	В сравнении с контрольной группой		В сравнении с группой больных гастритом	
		$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
Контрольная группа, n = 24	12 (50 %)				
ХГ, n = 91	62 (68,13 %)	2,72	P 1-2 = 0,099		
РЖ, n = 22	14 (63,64 %)	0,4	P 1-3 = 0,53	0,02	P 2-3 = 0,88
ЯБЖ, n = 37	24 (64,86 %)	1,33	P 1-4 = 0,24	0,13	P 2-4 = 0,72
ЯБДК, n = 48	40 (83,33 %)	7,28	P 1-5 = 0,007*	2,98	P 2-5 = 0,084
НПВП-гастропатии, n = 28	17 (60,71 %)	0,6	P 1-6 = 0,53	0,00	P 2-6 = 0,46
Заболевания желудочно-кишечного тракта, n = 226 (взрослые)	148 (65,49 %)	2,26	P 1-7 = 0,13		
Заболевания желудочно-кишечного тракта без гастритов, n = 179	135 (75,42 %)			1,62	P 2-8 = 0,2

\* При сравнении с контрольной группой различия достоверны (p < 0,05)

**Заключение**

Методика определения генотипов и аллельных вариантов *H. pylori* с использованием ПЦР позволяет определять генетическую структуру штаммов и их роль в развитии заболеваний ЖКТ. Достоверных различий между группами больных с заболеваниями ЖКТ и группой больных ХГ не выявлено (p > 0,05), что свидетельствует о близкой генетической струк-

туре *H. pylori* в группах пациентов с заболеваниями ЖКТ и характеризует региональные особенности штаммов. Достоверно реже встречаемые при ХГ генотипы babA2, ice A1, iceA2 в сравнении с ЯБДК и НПВП-гастропатиями, vacAm1, vacAm2, vacAs1, vacAm1s1+ vacAm2s2 в сравнении с ЯБДК (p < 0,05) свидетельствуют о позитивном влиянии менее агрессивных генотипов на течение заболевания. Достоверно чаще встре-

чается *cagA*-генотип при сравнении контрольной группы и группы пациентов с ЯБДК ( $p = 0,007$ ), что показывает значимость данного гена в развитии дуоденальных язв в Республике Беларусь.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration/ J. Atherton [et al.] // *J Biol Chem.* — 1995. — № 28. — P. 17771–17777.
2. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome C release / A. Galmiche [et al.] // *EMBO J.* — 2000. — № 19. — P. 6361–6370.
3. Covacci, A. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell / A. Covacci, R. Rappuoli // *J. Ex. Med.* — 2002. — № 191. — P. 587–592/
4. Пиманов, С. И. Эзофагит, гастрит и язвенная болезнь: рук-во для врачей / С. И. Пиманов. — Минск: Медицинская книга, 2000. — 378 с.
5. Современные представления об этиологии и патогенезе язвенной болезни / П. Я. Григорьев [и др.] // *Вестник АМН СССР.* — 1990. — № 3. — С. 60–64.
6. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging / D. Ilver [et al.] // *Science.* — 1998. — № 279. — P. 373–377.
7. Expression of Lewis b blood group antigen in *Helicobacter pylori* does not interfere with bacterial adhesion property / Peng-Yuan Zheng [et al.] // *World J Gastroenterol.* — 2003. — Vol. 9, № 1. — P. 122–124.
8. Клиническое значение факторов патогенности *Helicobacter pylori* / Е. В. Макаренко [и др.] // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* — 2005. — Т. 15, № 3. — С. 22–27.
9. Analysis of *iceA1* transcription in *Helicobacter pylori* / J. P. Donahue [et al.] // *Helicobacter.* — 2000. — Vol. 15, № 1. — P. 1–12.
10. DupA as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection / M. Douraghi [et al.] // *J. Med. Microbiol.* — 2008. — Vol. 57. — P. 554–556.
11. Tummuru, M. Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production / M. Tummuru, T. Cover, M. Blaser // *Infect Immun.* — 1993. — Vol. 61. — P. 1799–1809.
12. Argent, R. H. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR / R. H. Argent, Y. Zhang, J. C. Atherton // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 791–795.
13. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome / R. Peek [et al.] // *Proc. Assoc Am Physicians.* — 1998. — Vol. 110(6). — P. 531–544.
14. Correlation of the *Helicobacter pylori* Virulence and Adherence Factors *vacA*, *cagA* and *babA* with Ulcer Disease in Four Different European Countries / M. Gerhard [et al.] // *Gut.* — 2001. — № 1.
15. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori* / H. Lu [et al.] // *Gastroenterology.* — 2005. — Vol. 128. — P. 833–848.

Поступила 29.03.2011

УДК 577.3+57.052

### КОРРЕЛЯЦИЯ СТРУКТУРЫ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛ МЕЛАТОНИНА И ТРИПТОФАНА

В. Т. Чещевик<sup>1</sup>, С. Н. Соколовская<sup>1</sup>, Е. А. Лапшина<sup>2</sup>, С. Н. Ильина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, г. Минск

<sup>2</sup>Гродненский государственный аграрный университет

<sup>3</sup>Гродненский государственный медицинский университет

Изучали радикал-скэвенджерные свойства мелатонина и триптофана в системах, генерирующих алкоксильные и пероксильные радикалы (эритроциты человека, обработанные окислителем трет-бутилгидропероксид (тБГП)). Структурные и электронные свойства мелатонина, триптофана и окисленных производных данных молекул были исследованы теоретически с использованием AM1 полуэмпирического метода и ab initio метода. Высокая радикал-скэвенджерная способность мелатонина может быть обусловлена высокими значениями площади поверхности и дипольного момента молекулы, который отражает плотность заряда молекулы. С термодинамической точки зрения N1-ацетил- N2 -формил-5-метоксикинурамин (АФМК) является самым стабильным продуктом окисления мелатонина. Сравнительное исследование радикал-скэвенджерных, структурных и электронных свойства молекул мелатонина, его предшественника — триптофана продемонстрировало, что мелатонин в отличие от триптофана является потенциальным липидным антиоксидантом и эффективным скэвенджером алкоксильных и пероксильных радикалов.

Ключевые слова: структура, электронные свойства, радикал-скэвенджер, мелатонин, триптофан.

### STRUCTURE AND ANTIOXIDANT WCTIVITY ASSOCIWTIONS FOR MELATONIN MOLECULE AND ITS DERIVATIVTS

V. T. Cheshchevik<sup>1</sup>, S. N. Sakolouskaya<sup>1</sup>, E. A. Lapshina<sup>2</sup>, S. N. Iljina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut for Pharmacology and Biochemistry NAS Belarus, Minsk

<sup>2</sup>Grodno State Agricultural University

<sup>3</sup>Grodno State Medical University

Structural and electronic properties of melatonin, tryptophan, and oxidative products of these molecules were determined theoretically by performing semi-empirical and ab initio calculations. The radical scavenging effects of melatonin and tryptophan were studied using the alkoxy and peroxy radical-generating systems. We have shown that melatonin, rather than tryptophan, is a potent lipid antioxidant and an effective scavenger of alkoxy- and peroxy radicals.

Key word: structure, electronic properties, radical-scavenger, melatonin, tryptophan.