

УДК: 579.835:616.33:575.113.1

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВЗАЄМОДІЇ HELICOBACTER PYLORI З КЛІТИНАМИ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА

Д.С. СУХАНЬ<sup>1</sup>, С.В. ВЕРНИГОРОДСЬКИЙ<sup>2</sup>, Н.В. ГАЙДУКОВ<sup>3</sup>, Г.П. ЛЮДКЕВИЧ<sup>4</sup>

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, Україна

E-mail: d.suxan@gmail.com<sup>1</sup>, vernset@ukr.net<sup>2</sup>, nikita.omarov@gmail.com<sup>3</sup>, ludkeveech@gmail.com<sup>4</sup>

*У роботі проаналізовано сучасні погляди на класичні детермінанти вірулентності Helicobacter pylori, патогенетичні ефекти фосфорилування та процес транслокації CagA у клітини СОШ, охарактеризовані поверхневі мембранні рецептори зв'язування VacA з епітеліоцитами СОШ. Обґрунтовано необхідність проведення генетичного типування Helicobacter pylori для виявлення потенційної вірулентності мікроорганізму з метою прогнозування перебігу H. pylori-асоційованих захворювань та підбору таргетної терапії.*

**Ключові слова:** Helicobacter pylori, CagA, VacA, шлункова патологія.

**Вступ.** Відкриття інфекції Helicobacter pylori (H. pylori) зробило революцію в розумінні механізмів виникнення гастриту внаслідок визнання її як етіологічного фактора даного стану, що лежить в основі виразкової хвороби та раку шлунка [1]. Більше половини населення планети інфіковано H. pylori, і абсолютно всі інфіковані відповідають на колонізацію H. pylori слизової оболонки шлунка запаленням. Проте не у всіх людей виникає певна гастроентерологічна патологія. Подальший розвиток того чи іншого захворювання залежить від особливостей самого мікроорганізму, взаємодії його з хазяїном та оточуючим середовищем.

H. pylori – специфічний для людини патоген, що колонізується в слизовій оболонці шлунка [2–4]. Генетичні дослідження показали, що поширення H. pylori відбулось приблизно 58000 років тому, ще під час міграції людей з Африки, а бактеріальні генетичні ознаки H. pylori використовувалися в якості маркерів для відстеження складних демографічних подій в історії людства [2, 5, 6].

Використовуючи технологію типізації множинних алелей у локусах було виявлено, що штами

H. pylori розділенні на декілька основних кладів, які відображають філогенетичне походження відповідно до їх господарів, посиляючись на модель довготривалої адаптації [5, 7–9]. Задокументовані різноманітні механізми імунного ухилення від організму-господаря. Наприклад, виявляється, що інфекція H. pylori може ефективно перепрограмувати дендритні клітини на толерантний фенотип та індукувати регуляторні Т-клітини [2, 10]. Тому в сучасному суспільстві цей організм відповідає за високий рівень захворюваності і смертності, залишається одним з відомих факторів ризику розвитку раку шлунка [4, 6, 7, 11, 12].

Штами H. pylori різноманітні як в їх генетичній інформації, так і в потенціалі для індукування патогенності. Клінічний результат зараження H. pylori залежить від складного механізму реакцій між господарем та патогеном. Прогресування захворювання залежить від багатьох факторів, включаючи бактеріальний генотип і параметри навколишнього середовища [13–16].

Відомо, що більшість бактерій вільно плавають в слизовому гелі, а деякі адгезують безпосередньо до поверхні епітелію. Проте, відстань між бактерією та поверхнею шлунка не перевищує 25 мкм. Це дає можливість бути в безпосередній близькості біля епітелію, де H. pylori не підлягає розпізнаванню і елімінації з боку імунної системи слизової оболонки [7, 17, 18]. Це також дозволяє H. pylori доставляти бактеріальні продукти в епітелій, модулюючи запальні реакції для власної вигоди. Фактори вірулентності бактерії мають значний вплив на клінічні прояви. Тому H. pylori класифікують відповідно до наявних факторів вірулентності [7].

Існують два класичних детермінанта вірулентності H. pylori: CagA-білок який кодується острівцем патогенності cag PAI, і VacA-білок. Обидва ці фактори мають значний вплив на епітелій і імунну систему слизової оболонки та збільшують ризик

розвитку шлункової патології. Ці молекулярні фактори викликають великий науковий інтерес і піддаються інтенсивному дослідженню в усьому світі, так як механізми їх взаємодії з'ясовано не досконально [7, 13, 19].

**Загальна характеристика гену *cagA* та продуктів його експресії.** *CagA* (*cytotoxin-associated gene A*) – єдиний бактеріальний онкобілок, ідентифікований до теперішнього часу, що має молекулярну масу, яка коливається між 120 і 145 кДа. Гени, які кодують *CagA*, розташовані в острівці патогенності *cag PAI* (*Pathogenicity Associated Island*) [20]. Вважається, що бактерії-коменсали, еволюціонуючи в патогени, можуть одержати ділянку ДНК шляхом горизонтальної передачі генів з невідомих джерел, та інтегрувати їх в хромосоми. Блоки нових інтегрованих ДНК позначаються як острівці. У різних бактерій вони можуть кодувати різні функції. [21].

*Cag PAI* – острівець, локус близько 40 кб, що несе в собі до 32 генів та має фланкуючі ділянки з 31 пари нуклеотидів. Він був отриманий шляхом горизонтального переносу від невідомого джерела і інтегрований в хромосоми *H. pylori* [22]. Takeuchi Hayashi et al за допомогою структурних біологічних досліджень з використанням рентгенівської кристалографії виявили, що 70 % N-кінця *CagA*-протеїну мають унікальну сталу структуру, яка не має ніякої гомології з іншими відомими білками [23]. Інтеграція цього протеїну відбувається за рахунок IV секреторної системи (*T4SS*).

**Інтерналізація *CagA*-білка.** Дотепер відомо лише п'ять видів патогенних для людей бактерій, що мають систему секреції IV типу: *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella suis*, *Rickettsia prowazekii* та *H. pylori* [24].

Прототипом *T4SS* є система *Agrobacterium tumefaciens*, яка утворена 11 білками *VirB* (названими *VirB1-VirB11*) та білком зв'язування *VirD4*. Ці протеїни поділяються на три підгрупи: (1) цитоплазматичні або внутрішньо мембранні білки (АТФази *VirB4*, *VirB11*, *VirD4*); (2) субодиниці «основного каналу», що утворюють його центральну структуру між зовнішньою та внутрішньою бактеріальною мембраною (*VirB6-VirB10*); (3) зовнішні відростки піля, що складаються з *VirB2* та *VirB5* білків, та являють собою велику та малу субодиниці піля відповідно. Електронна мікроскопія візуалізували основний канал (41 нм) *T4SS*-комплекса в мембрані *H. pylori*, що складається з *CagE* (*VirB4*), *CagT* (*VirB7*), *CagX* (*VirB9*) і *CagY* (*VirB10*) – білків [6, 25–27]. В свою чергу, піль *H. pylori* складається з двох субодиниць: основного ортолога *VirB2* – білка *CagC*, та ортолога *VirB5* – білка *CagL*.

Функція *T4SS* (type IV secretion system) полягає в транспортуванні ефакторних молекул мікроорга-

нізму в клітини макроорганізму. Також відомо, що після контакту *H. pylori* з клітинами хазяїна індукуюється збір голкоподібної структури *T4SS*-піля [6, 27].

*H. pylori* вприскує продукт гену *cagA* – *CagA*-протеїн в мукоцит. Це можливо завдяки наступним механізмам.

1. **Тип IV-залежна транслокація *CagA* через Integrin- $\beta$ .** Відомо, що інтегрини є білками-рецепторами адгезії клітин ссавців, які приймають участь в багатьох процесах життєдіяльності клітин і містять в своєму складі  $\alpha$  та  $\beta$  поліпептидні ланцюги. Родина інтегринів складається з 24 гетеродимерних білків, які сприяють адгезії клітин до зовнішньо-клітинного матриксу в здорових тканинах. Штам *H. pylori* *cagA* використовує інтегрин  $\alpha 5\beta 1$  в якості рецептора, завдяки якому відбувається транслокація білка *CagA* до клітин господаря. В структурі *CagA* є N-кінцевий субдомен, що має форму одношарового  $\beta$ -листа, проксимальна частина якого приймає участь в утворенні комплексу з інтегріном  $\beta 1$ . *CagA* має високу спорідненість з очищеним інтегріном  $\alpha 5\beta 1$ , про що свідчить константа дисоціації  $K_d = 0,15$  нМ. У випадках змін в структурі *CagA* за рахунок рекомбінантних фрагментів, відбувається інгібування утворення комплексу з інтегріном  $\alpha 5\beta 1$  і, як наслідок, транслокації *CagA* [6, 28].

2. **Інтерналізація *CagA* шляхом зв'язування з мембрано-асоційованим фосфатидилсерином.** Процес транслокації *CagA* включає зв'язування *CagA* з фосфоліпідом мембрани клітини господаря – фосфатидилсерином. Для цього в білку існує декілька доменів, ключова роль серед них належить домену плекстрину, що зв'язує кислі фосфоліпіди. Канонічний – домен плекстрину має основний мотив K-Xn-K/RXR, в якому основні бічні ланцюги з лізину і аргініну опосередковують взаємодію з більшістю фосфатних груп. Заміна аргініну на аланін *in vitro* в відповідних положеннях анулювала зв'язування *CagA* з фосфатидилсерином [6].

3. **Тип IV-незалежне проникнення *CagA* за допомогою зовнішніх мембранних везикул.** Везикули зовнішньої мембрани (OMVs) – це наноструктури розміром від 20 до 300 нм, які цілеспрямовано продукуються практично всіма грамнегативними бактеріями. У випадку *H. pylori* вони заповнені периплазматичним вмістом, де і розташовується *CagA*. OMVs визнані в якості специфічного засобу для секреції, що забезпечує шлях транспортування сполук у позаклітинний простір. Ця властивість OMV дозволяє їм функціонувати як механізм для транспортування більшої частини біологічного матеріалу, виявленого в батьківській бактерії, в дистальні ділянки організму-господаря, забезпечуючи бактеріальний зв'язок, передачу факторів вірулентності.

OMV проникають в епітеліальні клітини слизової оболонки через ліпідні рафти, багаті на холестерин, таким чином доставляючи CagA в клітини господаря [29, 30].

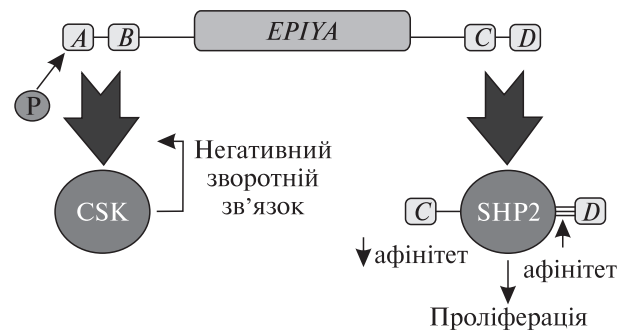
Після інтерналізації білок CagA запускає каскад реакцій для реалізації свого біологічного ефекту на клітину. Властивості до впливу на клітину господаря залежать від наявності особливих послідовностей амінокислот, названих мотивом EPIYA.

**Мотив EPIYA та його різновиди.** CagA-протеїн локалізується в плазматичній мембрані та містить радикали тирозину, які в епітеліальній клітині піддаються фосфорилюванню під дією кіназ сімейства Abl та Src. Ці кінази фосфорилюють залишки тирозину в послідовності амінокислот *Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala* (що дістала назву EPIYA). Мотив знаходиться в карбокси-кінці CagA та являє собою ділянку довжиною 20–50 амінокислот [31–33]. Існує 4 типи EPIYA, які ідентифіковані як EPIYA-A, -B, -C, -D в залежності від послідовності амінокислот, що оточують мотив [32, 34]. Виділяють західний та східний типи CagA через різні мотиви EPIYA. Західний CagA містить EPIYA-A, -B, -C, східний – EPIYA-A, -B, -D [29]. При фосфорилюванні тирозина в мотиві EPIYA сегменти EPIYA-A і -B виступають сайтами зв'язування для Csk (прото-онкогена, p38 – молекули-адаптера для тирозин фосфорилюваних білків). Активація Csk, в свою чергу, призводить до зменшення фосфорилювання EPIYA. Таким чином взаємодія CagA-Csk може створювати регуляторну петлю з негативним зворотнім зв'язком, яка попереджує надлишкове фосфорилювання тирозина, що може бути шкідливим для тривалої колонізації *H. pylori* у шлунку [35].

Сегменти EPIYA-C і -D слугують в якості сайтів специфічного зв'язування SHP-2 (тирозин-специфічної білкової фосфатази) [32]. Фосфорилюваний EPIYA-C (західний штаб) має низький афінитет до SHP-2, в той час як EPIYA-D (азіатський штаб), навпаки, високий, що може стати одним із пояснень більш високої захворюваності раком шлунка у носіїв цього штабу [31, 33] (рисунок).

**Механізми дії CagA на СОШ, незалежні від фосфорилювання.** Одними з найбільш важливих передумов канцерогенезу є порушення щільних контактів та апоптозу, індукція морфологічних змін [31]. Ці ефекти досягаються через вплив нефосфорилюваного CagA на такі сполуки як: протеїн адгезії E-кадгерин, рецептор до фактора росту гепатоцитів c-Met, регулятор афінності мікротрубочок PAR1b/MARK [36]. Послідовно розглянемо кожен з цих механізмів.

**E-кадгерин** – являє собою трансмембранний глікопротеїн, що з'єднує епітеліальні клітини для щільних клітинних контактів. Це кальцій-залежні зв'язки між E-кадгеринами на поверхні клітин. E-кад-



EPIYA – послідовність 20–50 амінокислот, що має типи A, B, C, D. P – фосфорилювання тирозину в мотиві EPIYA. Csk – молекула-адаптер для тирозин фосфорилюваних білків. SHP2 – тирозин-специфічна білкова фосфатаза. EPIYA A та B після фосфорилювання зв'язуються з Csk, а C та D – з SHP2

герин також виступає онкосупресором, шляхом утримання β-катеніна від зв'язування з генами проліферативного сигнального шляху Wnt. Втрата E-кадгерина асоціюється з поганим прогнозом у пацієнтів з різними видами раку [37].

*H. pylori* транслокує CagA білок до клітини господаря і дестабілізує комплекс E-кадгерин-β-катенін, розташований на мембрані. Результатом цієї взаємодії є вивільнення β-катеніна і переміщення його до ядра. Накопичення β-катеніна у ядрі клітини призводить до його з'єднання з кофакторами транскрипції сигнального шляху Wnt. В свою чергу E-кадгерин на мембрані стає функціонально нездатним до підтримання щільних клітинних зв'язків. [38, 39].

c-Met (фактор епітеліально-мезенхімального переходу) – тип рецептору до тирозинкінази, розташований на поверхні епітеліальної клітини, лігандом якого є фактор росту гепатоцитів (HGF). c-Met регулює гастрюляцію, ангиогенез, міграцію міобластів та розгалуження нервів у ембріогенезі, а також регенерацію тканин, та контролюється p53 [40]. Відбувається активне обговорення ролі зв'язування CagA з c-Met (135-кДа) рецептором [41].

Churin et al виявили, що взаємодія c-Met з CagA може призвести до активації PI3K. Активований PI3K стимулює фосфорилювання Akt, що в свою чергу сприяє експресії онкогенів через сигнальний шлях PI3K/Akt [42, 43].

Xiaojun Huang et al дослідили, що у CagA-позитивних випадках раку шлунка, пов'язаних з інфекцією *H. pylori*, експресія c-Met підвищувалася та була тісно пов'язана з c-Met-залежним сигнальним шляхом та інгібуванням апоптозу при неоплазії, інвазії та метастазах раку шлунка [44].

*PAR1b* також відома як кіназа 2 що регулює афінність мікротрубочок (MARK2), є членом сімейства PAR1/MARK кіназ, які відіграють ключову роль у створенні та підтримці полярності клітин, регулює стабільність мікротрубочок [45, 46].

Сильне інгібування PAR1b за допомогою *CagA* може порушити цілісність шару шлункового епітелію за допомогою двох механізмів: (1) порушення щільних з'єднань, викликаючи дефекти полярності, і (2) ремоделювання актину, що призводить до важкого гастриту і виразки. Проте патогенез порушення щільних з'єднань через пригнічення PAR1b потребує подальшого вивчення [41, 47].

З вищесказаного випливає, що механізмів впливу на клітину господаря у *H. pylori* безліч, і *CagA*, не зважаючи на його патологічні ефекти, є лише одним з токсинів цієї бактерії. Другим за поширеністю і значенням з них є *VacA*.

**Загальна характеристика гену *vacA* та продуктів його експресії.** Інший фактор патогенності *H. pylori* – моноцистронний ген *vacA* (*vacuolating-associated cytotoxin*) довжиною 3860-3940 пар азотистих основ [33, 48]. Рід *Helicobacter* включає в себе щонайменше 20 різних видів бактерій, проте *vacA* присутній лише у двох з них: *H. pylori* та *H. cetorum* [49]. Цей ген отримав назву «вакуолярного» через можливість викликати вакуолізацію цитоплазми епітеліальної клітини *in vitro*. Продукт гену – вакуолізуючий цитотоксин *VacA*, який формує пори в клітинних мембранах і створює можливість виходу аніонам та сечовині [33].

Ген *vacA* кодує білок, що має молекулярну масу близько 140 кДа, який підлягає Sec-залежному транспортуванню, та протеолітичному розщепленню з карбоксильного кінця. Внаслідок цього утворюється активний токсин масою біля 88кДа, та два пептида масою близько 12кДа та 33кДа відповідно. Активний токсин (88кДа) в присутності трипсина може піддаватись обмеженому протеолізу з отриманням фрагментів розмірами в 33кДа та 55кДа, які рахуються двома доменами *VacA* (функціональний р33 та зв'язуючий р55) [49, 50].

Ген *vacA* має мозаїчну структуру, що складається з трьох основних областей: сигнальної області (*s*-область), проміжної області (*i*-область) та середньої області (*m*-область) [51]. Кожну з цих областей можна розділити на два основних типи: *s1* чи *s2*, *i1* чи *i2* та *m1* чи *m2*. *S*-область знаходиться в домені р33 разом з *i*-областю, а *m*-область – в домені р55 [50]. Обидва домена – як р33 так і р55, необхідні для ефективного зв'язування токсину з плазматичною мембраною при зовнішньому додаванні *VacA* до клітин. В дослідженні на клітинній лінії *HeLa* виявлено, що мінімальна порція *VacA*, яка викликає вакуолізацію клітин, обов'язково потребує повний

домен р33 та хоча б 111 амінокислот домену р55 [49]. Розглянемо особливості кожного з вищевказаних доменів.

**Домен р55** відіграє важливу роль у зв'язуванні *VacA* з клітиною. Аналіз структури домена вказує на те, що він складається з правобічно-закрученої паралельної β-спіралі, що є характерною ознакою доменів-аутопортерів [52]. β-спіраль простягається до С-кінцевої ділянки домена р33 і переходить в нього [49, 50].

На основі *m*-області, що міститься в домені р55, токсин *VacA* поділяється на два типи *m1* і *m2*, що відрізняються можливістю зв'язуватися з різними рецепторами, взаємодією з клітинами господаря, а також рівнем експресії [3, 48]. Найчастіше застосовують методи порівняння клінічних проявів з різними типами *m*-області, що вказують на більшу кількість випадків раку шлунка при типі *m1* *VacA* порівняно з *m2*. Хоча клінічний ефект цих типів токсину відомий, але патогенез потребує подальшого вивчення.

**Домен р33.** Домен р33, а саме залишки амінокислот від 1 до 311, є функціональною ділянкою токсину *VacA* та викликає вакуолізацію клітин шляхом утворення аніон-селективних каналів. *s*-область, що є критично важливою для токсичності *VacA*, містить 32 гідрофобних залишка із α-спіральною структурою, що розташовані в N-кінцевій ділянці р33 [48–50].

Доведено, що р33 транслокується у мітохондрію та взаємодіє з її внутрішньою мембраною, формуючи у ній пору [53]. Jung Hock Foo et al довели, що домен р55 імпортувався в мітохондрії разом з доменом р33. Після цього субодиниця р33 інтегрально зв'язувалася з мітохондріальною внутрішньою мембраною, і обидва домена р33 і р55 виявлялись у мітохондріальному міжмембранному просторі [54].

Відомо, що *i*-область має не настільки виражений патогенний потенціал, як *s* та *m* області. Тип області *i* залежить від типів *s* та *m*, так, найчастіше в штамі *s1m1* визначається саме *i1*, що сумарно призводило до більшої тяжкості захворювання [48].

**Інтерналізація *VacA*-білка.** Проникнення *VacA* у клітину господаря через біліпідний шар є залежним від рН процесом. При низькому показнику рН домен р55 структурно змінюється та набуває гідрофобних властивостей, що посилює його поверхневу взаємодію з біліпідним шаром та полегшує проникнення через мембрану.

Відомо, що білок *VacA* може знаходитись в двох станах: *VacA* пов'язаний з OMV, та вільний *VacA*. Біологічна активність вільного *VacA* проявляється відразу після інтерналізації (явище ранньої інтерналізації), *VacA* пов'язаний з OMV залишається не активними протягом 72 год (пізня інтерналізація) [48–52].



**Рецептори, з якими взаємодіє VacA.** Невідомо чи пов'язується VacA з клітинами господаря за допомогою численних рецепторів одного типу чи взаємодіє з багатьма різними. Проте відомо, що VacA здатен приєднуватись як до білкових, так і до ліпідних рецепторів на поверхні епітеліальних клітин [50]. До них відносять:

**RPTP-β** (протеїн, подібний до рецептора тирозин фосфатази β) вважається головним рецептором при зв'язуванні VacA з клітинами. VacA приєднується до QTTQP послідовності рецептора (747–751 амінокислотні залишки) та пригнічує активність фосфатази. Інгібування RPTP-β призводить до вакуольно-незалежної цитотоксичності. Дослідження *in vivo* продемонстрували, що введення VacA мишам з RPTP-β призводить до пошкодження епітелію шлунку, тоді як миші позбавлені RPTP-β – стійкі до VacA-опосередкованого пошкодження [45–51].

**LRP1** (білок-рецептор до ліпопротеїнів низької щільності) є основним рецептором, що запускає VacA-залежний апоптоз. Відмічається, що формування малих вакуолей, завдяки зв'язуванню з LRP1, пов'язано з формуванням фагосом, на відміну від RPTP-β-пов'язаною вакуолізацією [48]. Взаємодія VacA з LRP1 призводить до накопичення вільних радикалів. Це в свою чергу веде до активації сигнального шляху Akt та елімінації p53, результатом чого є формування вакуолей. При цьому m2 VacA не зв'язується з LRP1, що відрізняє його від m1 VacA [54, 55].

**Фібронектин** є компонентом позаклітинного матриксу та бере участь у клітинних процесах проліферації та диференціюванні. Відома роль фібронектину у персистенції інфекції. Під час ІФА визначено, що VacA приєднується до фібронектину та в його присутності послаблює міжклітинні зв'язки у лінії *HeLa* [41, 55]. Це призводить до змін у клітинній морфології через реорганізацію цитоскелету [48–55]. Дослідження вказують, що фібронектин-опосередкований сигнал VacA регулюється інтегрином та Src [56].

Під час імунопреципітації, з використанням анти-EGFR антитіл, виявлено зв'язування EGFR з p33 та p55 доменами VacA. Ця взаємодія порушує сигнальний шлях ERK1/2, що відповідає за формування актинових стрес-волокон та регенерацію. VacA при зв'язуванні з EGFR інгібує респітелізацію та відновлення слизової оболонки [50, 51].

Відомо, що VacA взаємодіє з безліччю інших рецепторів, проте ці механізми залишаються не розкритими.

**Вплив VacA на клітини хазяїна.** Найбільш відома властивість VacA – здатність викликати вакуолізацію клітин. Мономерна форма VacA пов'язується

з плазматичною мембраною. Після цього токсин утворює олігомери, що переносяться в пізні ендосоми (ПЕ), де утворюють аніон-селективні канали. Через ці канали відбувається транзит іонів хлору в середину ПЕ, що призводить до збільшення концентрації Cl<sup>-</sup> та зниженню рН. По цій причині слабкі основи дифундують в ПЕ, де взаємодіють з протонами в кислому середовищі – спостерігається осмотичний набряк та вакуолізація клітини [48–52].

На сьогоднішній день відомо, що VacA є єдиним токсином *H. pylori*, який вражає мітохондрії. Він локалізується в ендосомальних включеннях та досягає внутрішньої мембрани мітохондрії, де формує аніонний канал. Це зменшує мембранний потенціал мітохондрії, веде до зменшення синтезу АТФ та до вивільнення цитохрому с. Активність VacA-каналу порушує морфологічну структуру мітохондрії через активацію динамін 1 – ключового фактору поділу мітохондрії. Токсин також веде до активації проапоптозних комплексів BAX/BAK та загибелі клітин господаря [50, 51].

При додаванні VacA в культивовані епітеліальні клітини підвищувалась проникність плазматичної мембрани, що призводило до виходу різних аніонів, таких як хлорид, сечовина, бікарбонат та ін. [49].

Також VacA індукує аутофагію, яка залежить від кількості токсину з виникненням мембранних каналів. Механізм за допомогою якого VacA індукує аутофагію не до кінця зрозумілий. Одна із гіпотез полягає в тому, що аутофагія являє собою відповідь клітини господаря на VacA для запобігання пошкодження клітин [48–54].

**Взаємодія CagA та VacA.** Крім того, що CagA та VacA впливають на слизову оболонку шлунка самостійно, їх асоціація є ключовим регулятором важкості захворювання. CagA здатен інгібувати внутрішньоклітинний трафік VacA та припиняти VacA-ініційований апоптоз [48]. Тож взаємодія CagA та VacA не є достовірно вивчена. Штами VacA s1, як правило містять острівцеві патогенності cag, тоді як в штаммах VacA s2 він відсутній [49–51].

**Висновки.** *H. pylori* в різних географічних регіонах виявляє варіабельність завдяки широкому набору факторів патогенності та різних штамів збудника. VacA є єдиним токсином, що порушує морфологічну структуру мітохондрії через активацію динамін 1 – ключового фактору поділу мітохондрії. Асоціація CagA та VacA є ключовим регулятором тяжкості захворювання. CagA здатен інгібувати внутрішньоклітинний трафік VacA та припиняти VacA-ініційований апоптоз. EPIYA-C (західний штам) має низький афінитет до SH. PYLORI2, що обумовлює низьку проліферативну активність. EPIYA-D (азіатський штам) навпаки – високий афінитет до SH. PYLORI2, що може стати одним із пояснень

більш високої захворюваності на рак шлунка у носіїв даного штаму.

Подальше вивчення молекулярно-генетичних аспектів взаємодії *H. pylori* з шлунковим епітелієм відкриє нові шляхи для більш глибокого розуміння патогенезу геолікобактеріозу та надасть можливість ефективно і диференційовано підходити до лікування *H. pylori*-асоційованих захворювань.

#### MOLECULAR AND GENETIC ASPECTS OF THE HELICOBACTER PYLORI INTERACTION WITH CELLS OF THE GASTRIC MUCOSA

D.S. Sukhan, S.V. Vernigorodskiy,  
N.V. Haidukov, H.P. Ludkevich

Vinnitsia National Pyrohov Memorial Medical University, Ukraine

E-mail: d.suxan@gmail.com, vernset@ukr.net,  
nikita.omarov@gmail.com, ludkevech@gmail.com

The modern views on the classical determinants of *Helicobacter pylori* virulence, the pathogenetic effects of phosphorylation and the process of translocation of CagA into the cells of the gastric mucosa (GM) were analyzed, and the surface membrane receptors of VacA binding to the epithelial cells of the GM were characterized in this study. The necessity of carrying out genetic typing of *Helicobacter pylori* to determine the potential virulence of a microorganism in order to predict the course of *H. pylori*-associated diseases and to select targeted therapy has been substantiated.

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ HELICOBACTER PYLORI С КЛЕТКАМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

Д.С. Сухань, С.В. Вернигородский,  
Н.В. Гайдуков, Г.П. Людкевич

В работе проанализированы современные взгляды на классические детерминанты вирулентности *Helicobacter pylori*, патогенетические эффекты фосфорилирования и процесс транслокации CagA в клетки СОЖ, охарактеризованы поверхностные мембранные рецепторы связывания VacA с эпителиоцитами СОЖ. Обоснована необходимость проведения генетического типирования *Helicobacter pylori* для определения потенциальной вирулентности микроорганизма с целью прогнозирования протекания *H. pylori*-ассоциированных заболеваний и подбора таргетной терапии.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kurinna, Y.G. Report on the Kyoto International Consensus on Gastritis Associated with *Helicobacter*

*pylori*, *Modern Gastroenterology*, 2016, vol. 86, no. 1, pp. 36–53.

2. Lind, J., Backert, S., and Hoffmann, R., Systematic analysis of phosphotyrosine antibodies recognizing single phosphorylated EPIYA-motifs in CagA of East Asian-type *Helicobacter pylori* strains, *BMC Microbiology*, 2016, vol. 16, no. 1, doi: 10.1186/s12866-016-0820-6.
3. Pachathundikandi, S. K., Lind, J., and Tegtmeyer, N., Interplay of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* with Toll-Like Receptors, *BioMed Res. Int.*, 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/192420.
4. Salama, N.R., Hartung, M.L., and Müller, A., Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 11, no. 6, pp. 385–99. doi: 10.1038/nrmicro3016.
5. Linz, B., Balloux, F., and Moodley, Y., An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*, *Nature*, 2007, vol. 445, no. 7130, pp. 915–8. doi: 10.1038/nature05562.
6. Backert, S., Tegtmeyer, N., Type IV Secretion and Signal Transduction of *Helicobacter pylori* CagA through Interactions with Host Cell Receptors, *Toxins*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 115. doi: 10.3390/toxins9040115.
7. Maixner, F., Krause-Kyora, B., and Turaev, D., The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman, *Science*, 2016, vol. 351, no 6269, pp. 162–5. doi: 10.1126/science.aad2545.
8. Amieva, M., and Peek, R.M., Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer, *Gastroenterology*, 2016, vol. 150, no. 1, pp. 64–78. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.004.
9. Moodley, Y., Linz, B., and Bond, R.P., Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man, *PLoS Pathogens*, 2012, vol. 8, no. 5. doi: 10.1371/journal.ppat.1002693.
10. Kodaman, N., Sobota, R.S. and Mera, R., Disrupted human-pathogen co-evolution: a model for disease, *Front. Genetics*, 2014, no. 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00290.
11. Yamaoka, Y., Graham, D.Y., *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis, *Future Oncology*, 2014, vol. 10, no. 8, pp. 1487–500. doi: 10.2217/fon.14.29.
12. Westmeier, D., Posselt, G., and Hahlbrock, A., Nanoparticle binding attenuates the pathobiology of gastric cancer-associated *Helicobacter pylori*, *Nanoscale*, 2018, 10, no. 3, pp. 1453–63. doi: 10.1039/c7nr06573f.
13. Backert, S., Clyne, M., and Tegtmeyer, N., Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*, *Cell Commun. Signal.*, 2011, 9, no. 1, pp. 28. doi: 10.1186/1478-811X-9-28.

14. Amieva, M.R., El-Omar, E.M., Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection, *Gastroenterology*, 2008, 134, no 1, pp. 306–23. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.009.
15. Atherton, J.C., Blaser, M.J., Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications, *J. Clin. Invest.*, 2009, 119, no. 9, pp. 2475–87. doi: 10.1172/JCI38605.
16. Polk, D. B. and Peek R. M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, vol. 10, no. 6, pp. 403–14. doi: 10.1038/nrc2857.
17. Schreiber, S., Konradt, M.C., and Groll, C., The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, no. 14, pp. 5024–9. doi: 10.1073/pnas.0308386101.
18. Schreiber, S., Buckner, R., and Groll, C., Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*, *Infect. Immunity*, 2005, vol. 73, no. 3, pp. 1584–9. doi: 10.1128/IAI.73.3.1584-1589.2005.
19. Backert, S., Tegtmeyer, N., The Versatility of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin VacA in Signal Transduction and Molecular Crosstalk, *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 69–92. doi: 10.3390/toxins2010069.
20. Hiroko, N., Masanori, H., Sequence Polymorphism and Intrinsic Structural Disorder as Related to Pathobiological Performance of the *Helicobacter pylori* CagA Oncoprotein, *Toxins*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 136. doi: 10.3390/toxins9040136.
21. Kostiuk, O.V., Pathogenicity factors of *H. pylori*: genotypic bases and phenotypic manifestations, *Preventive medicine*, 2012, vol. 2, no. 18, pp. 65–70.
22. Backert, S., Blaser, M.J., The Role of CagA in the Gastric Biology of *Helicobacter pylori*, *Am. Assoc. Cancer Res.*, 2016, vol. 76, no. 14, pp. 4028–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1680.
23. Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Kashiba, Y., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T., and Venugopalan, N., Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe*, 2012, no. 12, pp. 20–33. doi: 10.1016/j.chom.2012.05.010.
24. Kostyuk, O.V., Factors of pathogenicity *H. pylori*: genotypical bases and phenotypic manifestations, *Profilakt. medicine: scientific and practical journal*, 2012, no. 2, pp. 65–70.
25. Shariq, M., Kumar, N., and Kumari, R., Biochemical Analysis of CagE: A VirB4 Homologue of *Helicobacter pylori* Cag-T4SS, *PLoS One*, 2015, vol. 11, no. 10. doi: 10.1371/journal.pone.0142606.
26. Zhang, J., Fan, F., and Zhao, Y., Crystal structure of the type IV secretion system component CagX from *Helicobacter pylori*, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 2017, vol. 73, no. 3, pp. 167–73. doi: 10.1107/S2053230X17001376.
27. Merino, E., Flores-Encarnaciyn, M., and Aguilar-Gutiérrez, G.R., Functional interaction and structural characteristics of unique components of *Helicobacter pylori* T4SS, *FEBS Journal*, 2017, vol. 284, no. 21, pp. 3540–9. doi: 10.1111/febs.14092.
28. Sause, W. E., Keilberg, D., Aboulhoda, S., and Ottemann, K.M., The *Helicobacter pylori* Autotransporter ImaA Tempers the Bacterium's Interaction with  $\alpha 5\beta 1$  Integrin, *Infect Immun.*, 2017, vol. 85, no. 1. doi: 10.1128/IAI.00450-16.
29. Ko, S. H., Rho, D. J., Jeon, J. I., Kim, Y. J., Woo, H. A., Kim, N., and Kim, J.M., Crude Preparations of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles Induce Upregulation of Heme Oxygenase-1 via Activating Akt-Nrf2 and mTOR-I $\kappa$ B Kinase-NF- $\kappa$ B Pathways in Dendritic Cells, *Infect. Immun.*, 2016, vol. 84, no. 8, pp. 2162–74. doi: 10.1128/IAI.00190-16.
30. Park, N.H., Song, M.S., Shin, S.Y., Jeong, J.-H., and Lee, H.Y., The effects of medication adherence and health literacy on health – related quality of life in older people with hypertension, *Int. J. Older People Nurs.*, 2018, vol. 13, no 3. doi: 10.1111/opn.12196.
31. Jones, K.R., Whitmire, J.M., and Merrell, D.S., A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease, *Front. Microbiol.*, 2010, 1. doi: 10.3389/fmicb.2010.00115.
32. Nishikawa, H., Hatakeyama, M. Sequence Polymorphism and Intrinsic Structural Disorder as Related to Pathobiological Performance of the *Helicobacter pylori* CagA Oncoprotein, *Toxins*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 136. doi: 10.3390/toxins9040136.
33. Palcev, M.A., Cactursky, L.V., and Zayratyants, O.V., *Pathological Anatomy: National Leadership*, Moscow: GEOTAR-MEDIA, 2013 (in Russian).
34. Chomvarin, C., Phusri, K., Sawadpanich, K., Mairiang, P., Namwat, W., Wongkham, C., and Hahn-vajanawong, C., Prevalence of cagA EPIYA motifs in *Helicobacter pylori* among dyspeptic patients in Northeast Thailand, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 2012, vol. 42, no. 1, pp. 105–15.
35. Hatakeyama, M., *Helicobacter pylori* CagA and Gastric Cancer: A Paradigm for Hit-and-Run Carcinogenesis, *Cell Host Microbe*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 306–16. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.008.
36. Buzás, G.M., *Helicobacter Pylori: A Worldwide Perspective 2014*, Budapest: Bentham Science Publishers, 2014.
37. Wong, S.H.M., Fang, C.M., and Chuah, L.-H., E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications, *Crit. Rev. Oncology/Hematology*, 2018, 121, pp. 11–22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.
38. Tegtmeyer, N., Backert, S., *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori*, Switzerland: Springer, 2017.



39. Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori*, *Cell Commun. Signal.*, 2011, vol. 9. doi: 10.1186/1478-811X-9-29.
40. Zhang, Y., Xia, M., and Jin, K., Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities, *Mol. Cancer*, 2018, vol. 17, no. 1. doi: 10.1186/s12943-018-0796-y.
41. Steffen, B. and Yoshio, Y. *Helicobacter pylori Research: From Bench to Bedside*, Japan: Springer, 2016.
42. Li, N., Tang, B., and Jia, Y., *Helicobacter pylori* CagA Protein Negatively Regulates Autophagy and Promotes Inflammatory Response via c-Met-PI3K/Akt-mTOR Signaling Pathway, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, no. 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00417.
43. Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T.F., Birchmeier, W., and Naumann, M., *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response, *J. Cell Biol.*, 2003, vol. 161, no. 2, pp. 249–55. doi:10.1083/jcb.200208039.
44. Huang, X., Wang, C., Sun, J., Luo, J., You, J., Liao, L., and Li, M., Clinical value of CagA, c-Met, PI3K and Beclin-1 expressed in gastric cancer and their association with prognosis, *Oncol Lett.*, 2018, vol. 15, no. 1, pp. 947–55. doi: 10.3892/ol.2017.7394.
45. Hiroko, N., Masanori, H., Sequence Polymorphism and Intrinsic Structural Disorder as Related to Pathobiological Performance of the *Helicobacter pylori* CagA Oncoprotein, *Toxins*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 136. doi: 10.3390/toxins9040136.
46. Yamahashi, Y., Saito, Y., Murata-Kamiya, N., and Hatakeyama, M., Polarity-regulating Kinase Partitioning-defective 1b (PAR1b) Phosphorylates Guanine Nucleotide Exchange Factor H1 (GEF-H1) to Regulate RhoA-dependent Actin Cytoskeletal Reorganization, *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 52, pp. 44576–84. doi: 10.1074/jbc.M111.267021.
47. Nishikawa, H., Hayashi, T., and Arisaka, F., Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b, *Sci. Reports*, 2016, vol. 6, no. 1. doi: 10.1038/srep30031.
48. Fahimi, F., Tohidkia, M.R., and Fouladi, M., Pleiotropic cytotoxicity of VacA toxin in host cells and its impact on immunotherapy, *BioImpacts*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 59–71. doi: 10.15171/bi.2017.08.
49. Foegeding, N., Caston, R., and McClain, M., An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Bio-logy, *Toxins*, 2016, vol. 8, no. 6, pp. 173. doi: 10.3390/toxins8060173.
50. Chauhan, N., Tay, A.C.Y., Marshall, B.J., and Jain, U., *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview, *Helicobacter*, 2018, no. 16. doi: 10.1111/hel.12544.
51. McClain, M.S., Beckett, A.C., and Cover, T.L. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer, *Toxins*, 2017, vol. 12; no. 10. doi: 10.3390/toxins9100316.
52. Ivie, S.E, McClain, M.S., and Algood, H., Analysis of a  $\beta$ -helical region in the p55 domain of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin, *BMC Microbiology*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 60. doi: 10.1186/1471-2180-10-60.
53. Palframan, S. L., Kwok, T., and Gabriel, K., Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis, *Front. Cell. Inf. Microbiol.*, 2012, 2:92. doi: 10.3389/fcimb.2012.00092.
54. Foo, H., Culvenor, J.G., and Ferrero, R.L., Both the p33 and p55 Subunits of the *Helicobacter pylori* VacA Toxin Are Targeted to Mammalian Mitochondria, *J. Mol. Biol.*, 2010, vol. 401, no. 5, pp. 792–8. doi: 10.1016/j.jmb.2010.06.065.
55. Yahiro, K., Hirayama, T., and Moss, J., New Insights into VacA Intoxication Mediated through Its Cell Surface Receptors, *Toxins*, 2016, vol. 8, no. 5, pp. 152. doi: 10.3390/toxins8050152.

Надійшла в редакцію 10.12.2018  
Після доопрацювання 19.02.19  
Прийнята до друку 18.11.2019