

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА  
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР  
БЕРУВЧИ DSc.29.12.2018.V.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ  
АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ**

**АБДУРАХИМОВ АБРОРЖОН АКРАМОВИЧ**

***HELICOBACTER PYLORI* БАКТЕРИЯСИНИНГ ВИРУЛЕНТ  
ФАКТОРЛАРИНИ ГЕНЕТИК ЖИҲАТДАН ЎРГАНИШ**

**03.00.01 – Биокимё, 03.00.03 – Молекуляр биология. Молекуляр генетика. Молекуляр  
биотехнология**

**биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси**

**АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2019**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси**  
**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)**  
**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)**

<b>Абдурахимов Аброржон Акромович</b> <i>Helicobacter pylori</i> бактериясининг вирулент факторларини генетик жихатдан ўрганиш. ....	5
<b>Абдурахимов Аброржон Акромович</b> Исследование генетических факторов вирулентности бактерии <i>Helicobacter pylori</i> .....	21
<b>Abduraximov Abrorjon Akromovovich</b> Investigating genetic factors of <i>Helicobacter pylori</i> virulence .....	39
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works. ....	42

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА  
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР  
БЕРУВЧИ DSc.29.12.2018.V.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ  
АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ**

**АБДУРАХИМОВ АБРОРЖОН АКРАМОВИЧ**

***HELICOBACTER PYLORI* БАКТЕРИЯСИНИНГ ВИРУЛЕНТ  
ФАКТОРЛАРИНИ ГЕНЕТИК ЖИҲАТДАН ЎРГАНИШ**

**03.00.01 – Биокимё, 03.00.03 – Молекуляр биология. Молекуляр генетика. Молекуляр  
биотехнология**

**биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси**

**АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2019**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2018.4.PhD/B144 рақами билан рўйхатга олинган.**

Диссертация Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгашнинг веб-саҳифасида [www.ibb-nuu.uz](http://www.ibb-nuu.uz) ва «Ziynet» Ахборот таълим порталида ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

**Илмий раҳбар:**

**Турдикулова Шахлохон Уткуровна**  
биология фанлари доктори

**Расмий оппонентлар:**

**Абдуллаев Алишер Абдумавлянович**  
биология фанлари доктори

**Далимова Сурайё Нугмановна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Етакчи ташкилот:**

**Геномика ва биоинформатика маркази**

Диссертация химояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги илмий даражалар берувчи DSc.29.12.2018.B.01.13 рақамли Илмий кенгаш асосидаги бир марталик Илмий кенгашнинг 2019 йил «\_\_\_» \_\_\_\_\_ соат \_\_\_\_\_ даги мажлисида бўлиб ўтади. Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй (Ўзбекистон Миллий университети, Кимё факультети биноси 4-қавати) Тел.: (99871) 246-68-96.

Диссертация билан Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (\_\_\_\_\_ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96, e-mail: [ibb-nuu@mail.ru](mailto:ibb-nuu@mail.ru).

Диссертация автореферати 2019 йил «\_\_\_» \_\_\_\_\_ куни тарқатилди (2019 йил «\_\_\_» \_\_\_\_\_ даги \_\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси).

**Сабилов Равшан Заирович**

Илмий даражалар берувчи бир марталик  
илмий кенгаш раиси, б.ф.д., академик

**Асраров Музаффар Исламович**

Илмий даражалар берувчи бир марталик  
илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д., профессор

**Шеримбетов Санжар Гулмирзоевич**

Илмий даражалар берувчи бир марталик  
илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д.

## КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Ҳозирги кунда дунё аҳолисининг ярмидан кўпи *Helicobacter pylori* бактерияси билан инфекцияланган бўлсада, маълум штамлари ошқозон-ичак касалликларини ривожлантириши исботланган. Мазкур касалликларнинг пайдо бўлишида инсонларнинг турмуш тарзи, ирсияти, овқатланиши, зарарли одатлар ва ушбу бактериянинг патогенлик даражаси ҳам муҳим аҳамиятга эга. *H.pylori* геномидаги 62 та вирулент генлар бактериянинг патогенлик хусусиятини намоён қилиши тасдиқланган. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилотининг маълумотида кўра дунё бўйича йилига 7 миллион аҳоли ошқозон-ичак касалликлари билан рўйхатга олинади ва мазкур касалликлар оқибатида юз минглаб ўлим ҳолатлари кузатилади<sup>1</sup>. Ўзбекистонда 2017 йил 13,4 % аҳоли ошқозон-ичак касалликлари билан рўйхатга олинган бўлиб, барча касалликлар ичида иккинчи ўринни эгаллаган<sup>2</sup>. *H.pylori* мавжудлиги ҳамда патогенлик даражасини аниқлаш мазкур касалликларни олдини олиш ва даволашда муҳимлиги белгиланган.

Жаҳонда йирик илмий тадқиқот марказларида олиб борилаётган тажрибаларда *H.pylori* бактериясининг ошқозон эпителиал ҳужайраларига таъсири, мазкур бактериянинг патогенлик даражаси унинг вирулент генларига боғлиқлиги аниқланган. Шунингдек, ҳудудлар бўйича бактерия инфекциясининг тарқалиши, маҳаллий изолятларга хос ўзгаришларни ва касалликлар билан ассоциациясини скрининг қилиш муҳимлиги келтирилган. Натижада ҳар бир ҳудуд учун патоген изолятларни аниқловчи тест системалари яратилмоқда.

Мамлакатимизда ошқозон-ичак касалликларида *H.pylori* бактериясининг скрининг қилишнинг замонавий усуллари ишлаб чиқилган. Мазкур йўналишда амалга оширилган чора тадбирлар асосида, муайян натижаларга, гастроэнтерологик касалликларнинг даволаш самарадорлигини оширишга эришилди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш» ва «аҳолини ижтимоий ҳимоя қилиш ва соғлиқни сақлаш тизимини такомиллаштириш»<sup>3</sup> вазифалари белгиланган. Бу борада, мазкур бактерияни эрта ташхислаш, *H.pylori* патогенлик даражасини аниқлаш, маҳаллий бактерия штаммлардаги вирулент маркер генларни ўзига хос хусусиятларни аниқлаш ёрдамида ҳудуд учун мос тест системаларни ишлаб чиқиш ҳамда молекуляр-генетик усуллари йўлга қўйиш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини янада

<sup>1</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/ru>

<sup>2</sup> <http://stat.uz/uploads/docs/zdravoxraneniya-2017-uz.pdf>

<sup>3</sup> Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги ПФ-4947-сон фармони

ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 20 июндаги ПҚ-3071-сон «Ўзбекистон Республикаси аҳолисига 2017-2021 йилларда ихтисослаштирилган тиббий ёрдам кўрсатишни янада ривожлантириш чоратадбирлари тўғрисида»ги қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устивор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялари ривожланишининг устивор йўналишларидан VI. «Тиббиёт ва фармакология» устивор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Австралиялик олимлар *H.pylori* бактерияси ошқозон-ичак касалликларини ривожлантиришини аниқлаган (Marshall B.J., Warren J.R., 1984). *H.pylori* бактериясининг ошқозон эпителиал хужайраларига салбий таъсири (Atherton J. 1995; Cover T. 2005, Fahimi 2017), бактериянинг вирулент *VacA*, *CagA* ва *IceA* генларининг молекуляр генетик ва биокимёвий хусусиятлари (Yamaoka Y, 1999; Wroblewski L. 2010;) ёритилган. Бактерия геноми АҚШ олимлари (Tomb J.F. ва бошқалар 1997) томонидан сиквенс қилинган. Хитойлик олимлар (Hooi J. ва бошқалар, 2017) *H.pylori* бактериясининг Қозоғистон ҳудудидаги изолятларни генотиплаган.

МДХ давлатларидан *H.pylori* нинг тарқалиши ва унинг касалликлар билан боғлиқлигини Момыналиев К.Т. (2009), Антонова О.С., Белов Ю.В. (2010) ва Татаренко Д.П. (2016) каби бир гуруҳ олимлар аниқлаган.

Ўзбекистонда Баженов Л.Г. (1998) микробиологик усул билан, Х.А.Ибрагимов (2011) Оролбўйи ҳудудида молекуляр-генетик усуллар ёрдамида, Абдиев С. (2010) иммунофермент таҳлили, Хегай Т.Р. (2014) мультилокусли секвенс усуллари ёрдамида *H.pylori* бактерияси инфекциянинг тарқалишини аниқлаган. Юқорида келтирилган тадқиқот натижаларида республикамиз ҳудудидаги *H.pylori* бактериясининг тарқалиши ва гастроэнтерологик касалликлар билан ассоциацияси бўйича маълумотларни етарли даражада деб бўлмайди. Шунингдек, Ўрта Осиё ҳудудидаги *H.pylori* бактерияси штаммларининг *VacA* гени секвенси амалга оширилмаган.

**Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Биофизика ва биокимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф4-Т106 «Ўзбекистонда биочиплар ва мультилокусли секвенирлаш технологияси ёрдамида *Helicobacter pylori* генетик хилма-хиллигини ўрганиш» фундаментал лойиҳаси (2007-2011) ва Биоорганик кимё институтида ЁА 10-ФА-Т039 сонли «Аниқ вақтдаги ПЗР (Real-time PCR) методида *H.pylori* антибиотикка чидамлилигини аниқлашнинг тест-методикасини ишлаб чиқиш» ёш олимлар амалий лойиҳаси (2016-2017) доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** *H.pylori* бактериясининг генетик факторларини гастроэнтерологик касалликлар билан боғлиқлигини аниқлашдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

гастроэнтерологик беморлар биологик намуналаридан *H.pylori* бактериясининг ДНК банкини яратиш;

*H.pylori* бактериясининг вирулент маркер CagA, VacA, IceA генларининг тарқалишини ҳамда гастроэнтерологик касалликлар ривожланиши билан боғлиқлигини аниқлаш;

гастроэнтерологик касалликларда вирулент генларнинг касаллик ривожланишидаги хавф даражасини аниқлаш;

*H.pylori* бактериясининг вирулент генларни аниқлашда қўлланиладиган ПЗР (полимераза занжир реакцияси) усулини такомиллаштириш;

маҳаллий бактерияларнинг VacA генини нуклеотидлар кетма-кетлигининг бирламчи структурасини аниқлаш ва молекуляр-биокимёвий таҳлил қилиш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида ошқозон-ичак касаллигига чалинган беморлардаги *H.pylori* изолятлари ДНКси, назорат штамми сифатида АТСС (Америка штаммлар ва тўқималар коллекцияси)дан HP-26695 штаммининг ДНКси олинган.

**Тадқиқотнинг предмети** *H.pylori* вирулент CagA, VacA, IceA генлари ва уларнинг вариантларини аниқлаш, ПЗР методларини такомиллаштириш ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқот ишини бажаришда центрифугалаш, нуклеин кислоталарни ажратиш, спектрофотометрия, генларни амплификация қилиш, гель-электрофорез, секвенс усулларидан шунингдек, биоинформатик ва статистик дастурлардан фойдаланилган.

**Тадқиқотнинг илмий янгилigi** куйидагилардан иборат:

*H.pylori* бактериясининг вирулент CagA, IceA ва VacA генларининг тарқалиш частотаси ҳамда CagA, IceA1 генлари ва VacA генининг s1/m1/m2 типлари билан гастроэнтерологик касалликлар ўртасидаги ассоциация аниқланган;

*H.pylori* бактериясининг вирулент CagA, VacA генларини генотиплаш учун мультитиплекс ПЗР усули ишлаб чиқилган;

CagA генини аниқлаш учун Real-time PCR усули ишлаб чиқилган;

Ўзбекистон ҳудудидаги *H.pylori* бактерияси изолятларининг VacA гени секвенс натижаларига кўра аввал аниқланмаган нуклеотидлар мутацияси аниқланган ва ушбу мутациялар фақат маҳаллий изолятлар учун хослиги ҳамда маҳаллий изолятлар дунёнинг бошқа штаммларидан фарқланиши исботланган.

**Тадқиқотларнинг амалий натижалари** куйидагилардан иборат:

ошқозон суяқлигидаги *H.pylori* бактериясини қисқа вақт ичида молекуляр-генетик усуллар орқали бактериянинг патоген изолятларини аниқлаш мумкинлигини исботланган;

*H.pylori* бактериясининг патоген изолятларини аниқлашда мультитиплекс ПЗР ҳамда Real-time PCR методлари ишлаб чиқилган;

CagA, IceA1, VacA s1/m1/m2 генотипга эга бактерия изолятлари патогенлиги юқори эканлиги аниқланган;

маҳаллий *H.pylori* изолятлари VacA генининг бирламчи структураси аниқланган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** тадқиқот натижалари замонавий биокимёвий, молекуляр-биологик ва молекуляр-генетика усулларни қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Назорат ва тажрибада олинган қийматлар Фишер  $\chi^2$ -тести бўйича ҳисобланган ва қийматлар фарқининг статистик ишончлилиги  $P < 0,05$  даражасида ифодаланган. Секвенс натижалари NCBI (The National Center for Biotechnology Information) маълумотлар базаси билан таққосланган. Олинган натижаларнинг ишончлилиги уларнинг республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокамаси, натижалар рецензияланган илмий нашрларда нашр этилганлиги билан изоҳланган.

**Тадқиқот натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *H.pylori* бактериясининг патоген изолятларини идентификация қилишда номзод генларнинг танлаб олингани, вирулент CagA ва VacA генларини бир вақтда аниқлаш учун мультиплекс ПЗР ҳамда CagA генини аниқлашда Real-Time PCR усулларини ишлаб чиқилганлиги, VacA генининг секвенс қилиш учун махсус праймерлар дизайни яратилганлиги, VacA гени секвенс натижаларига асосан маҳаллий изолятлар дунё штаммларидан фарқ қилиши билан исботланади.

Тадқиқот натижаларнинг амалий аҳамияти шундан иборатки, патоген штаммларни аниқлашда асосий материал бўлиши мумкинлиги, мультиплекс ПЗР, Real-Time PCR усулларидан республикамиз клиникаларида фойдаланиб *H.pylori* бактерияси патоген изолятларини аниқлашда фойдаланиш мумкинлиги билан изоҳланади. VacA гени секвенс натижаларига асосланган ҳолда маҳаллий изолятлар учун махсус ПЗР тест системасини яратиш учун асос бўлади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Маҳаллий *H.pylori* бактерияси изолятларини вирулент CagA, IceA ва VacA генлари бўйича генотиплаш, VacA генини секвенирлаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

полимераза занжир реакцияси (ПЗР) методи ФА-Ф6–Т219 рақамли «Маҳаллий *Lactobacillus casei group* штаммлари томонидан бактериоцинга ўхшаш моддаларнинг ошқозон ва ўн икки бармоқли ичак касаллигини чакирувчи *Helicobacter pylori* га қарши таъсирини ўрганиш» мавзусидаги фундаментал лойиҳада маҳаллий *H.pylori* культураларини идентификация қилишда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 4 мартдаги 4/1255-586-сон маълумотномаси). Натижада бактерия культураларини аниқлашда юқори спецификликка эришиш ҳамда *H.pylori* бактериясининг нопатоген ва патоген штаммларини аниқлаш имконини берган;

такомиллаштирилган мультиплекс ПЗР методи ФА-Ф6–Т219 рақамли «Маҳаллий *Lactobacillus casei group* штаммлари томонидан бактериоцинга

ўхшаш моддаларнинг ошқозон ва ўн икки бармоқли ичак касаллигини чақирувчи *Helicobacter pylori*га қарши таъсирини ўрганиш» мавзусидаги фундаментал лойиҳада нопатоген ва патоген бактерия культураларни аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 4 мартдаги 4/1255-586-сон маълумотномаси). Натижада бактерия культураларини аниқлашда реактивларни уч баробар тежаш ва иқтисодий самарадорликка эришиш имконини берган;

маҳаллий *H.pylori* бактерия изолятлари VacA генининг нуклеотидлар (KY779729.1, KY779730.1) ва аминокислоталар (AVH78333.1, AVH78334.1) кетма-кетлиги NCBI ва ENA ҳалқаро маълумотлар базасига киритилган (Калифорния университетининг 2019 йил 17 январдаги маълумотномаси). Натижада Ўзбекистон ҳудудида тарқалган *H.pylori* изолятларини ўзига хослигини аниқлаш ҳамда ушбу сиквенс маълумотларидан дунёнинг турли минтақаларида учровчи штаммларни таққослаш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Тадқиқот натижалари асосида 6 та халқаро ва 13 та республика илмий-амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 25 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикасининг Олий аттестация комиссиясининг фалсафа доктори (PhD) диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 6 та мақола, жумладан, 2 таси хорижий ва 4 таси республика журналларда нашр этилган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловадан иборат. Диссертациянинг ҳажми 116 бетни ташкил этган.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

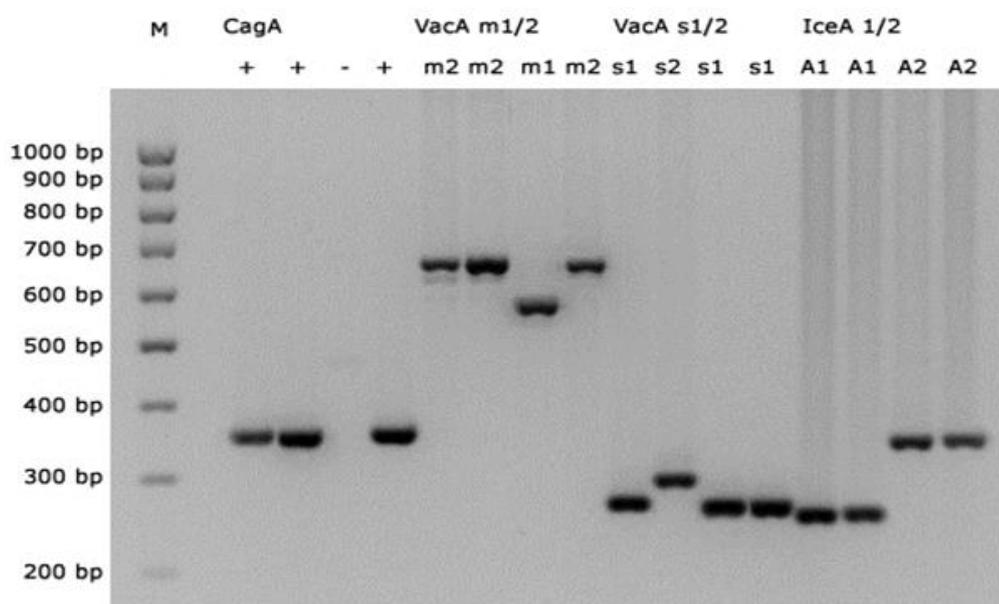
**Кириш** қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «*Helicobacter pylori* бактерияси ҳақида умумий маълумот» деб номланган биринчи бобида *H.pylori* бактерияси ҳар томонлама таҳлил қилиниб, мавжуд ҳолатга илмий нуқтаи назардан баҳо берилган. Мазкур бобда *H.pylori* бактериясининг кашф қилиниш тарихи, инфекциясининг тарқалиши, бактериянинг биологияси, патогенлик хусусиятлари таҳлил қилинган ва замонавий текшириш усуллари ҳақида маълумотлар берилган. *H.pylori* генетикаси бўйича VacA, CagA ва IceA генларининг тузилиши ва функцияси кўриб чиқилган.

Диссертациянинг «*Helicobacter pylori* бактериясини идентификациялашда қўлланилган замонавий усуллар» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотларни олиб бориш босқичлари, уларнинг бажарилишида фойдаланилган материаллар ва услублар келтирилган. Хусусан, тадқиқотлар учун Ўзбекистон ҳудудида яшайдиган 134 нафар гастроэнтерологик 16–75 ёш (ўртача  $46 \pm 1,5$  ёш) оралиғидаги беморлар ҳамда 76 та шартли соғлом одамлар олинган. Бундан ташқари маҳаллий *H.pylori* Hp132, Hp142, Hp1740, Hp1741, Hp1742, Hp1743 ва Hp1749 изолятлари олинган. Илмий тадқиқотни бажаришда ДНК ажратиш, гель-электрофорез, спектрофотометрия, полимераза занжир реакцияси (ПЗР), флуориметрия, секвенс усулларида шунингдек, биоинформатик ва статистик дастурлардан фойдаланилган.

Диссертациянинг «*Helicobacter pylori* бактериясини вирулент генлари бўйича генотиплаш ва ошқозон-ичак касалликлари билан боғлиқлигини аниқлаш» номли учинчи бобида *H.pylori* бактерияси вирулент CagA, VacA, IceA генларининг учраш частотаси ва ушбу генларининг касалликлар билан ассоциацияси тадқиқ қилинган.

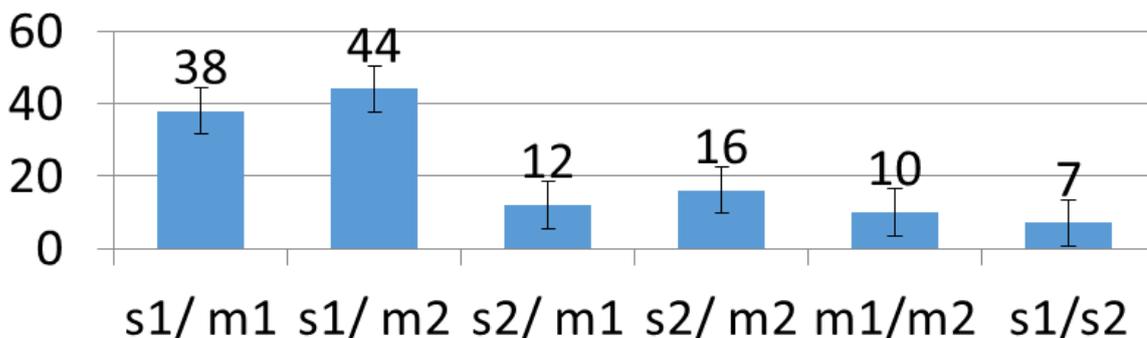
*H.pylori* бактериясининг ассий вирулент CagA гени, VacA генининг s ва m типларини ҳамда IceA генининг аллеллари бўйича генотиплаш мақсадида ПЗР ўтказилган. ПЗР амплификация маҳсулоти маълумотлар базасига ҳамоханг равишда CagA 349, VacA s1 259, s2 286, m1 570, m2 645, IceA1 247 ва IceA2 334 жуфт нуклеотидни ташкил қилган (1- расм).



1-расм. *H.pylori* CagA, VacA s, m-регионлари ҳамда IceA1 ва IceA2 генларининг ПЗР амплификация фрагменти. M-маркер. CagA- 349 ж.н. + CagA гени мавжуд. -CagA гени мавжуд эмас. VacA s1-259 ж.н., VacA s2- 286 ж.н., VacA m1-570 ж.н., VacA m2- 645 ж.н., IceA1-247 ж.н., IceA2-334 ж.н. (bp – base pair (ж.н.) жуфт нуклеотид).

Жами 134 нафар гастроэнтерологик беморларда *H.pylori* бактериясининг вирулент генлари бўйича генотиплаш натижасида CagA+ 106та (79%), VacA 110та (82%), IceA (111 та) 82,8 % да эканлиги аниқланди. IceA1 аллели IceA2 аллелига қараганда 2,7 марта кўп учраган бўлиб, 20 та беморда (18 %)

IceA1/IceA2 аллелларига эга коинфекция аниқланди. 134 та бемордан 110 тасида VacA гени аниқланган бўлиб, VacA генининг s1 типи s2 типига қараганда 2,7 марта, m2 типи m1 типига қараганда 1,1 марта кўп учраган. VacA s1/m2 (44) ва s1/m1 (38) генотиплари s2/m1 (12), s2/m2 (16) генотипларга қараганда кўп учраши аниқланди (2-расм). 17 та (15,4%) беморларда VacA генотиплари бўйича коинфекция аниқланди. Яъни 7 та беморда s1/s2, 10 та беморда m1/m2 генотиплари аниқланди (2-расм).



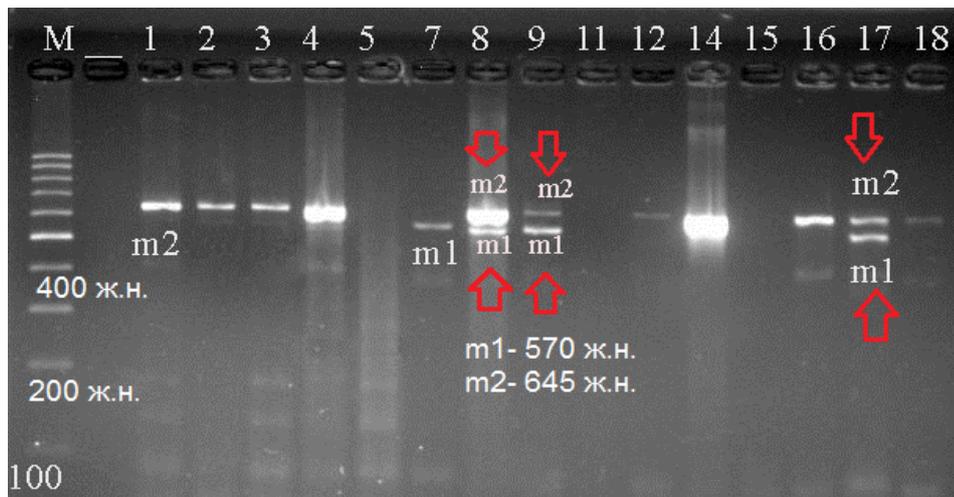
2-расм. VacA генини s ва m аллелларини комбинациялари (Натижалар сонда берилган).

*H. pylori* CagA<sup>++</sup>VacA s1/m2 (43 та) ва CagA<sup>++</sup>VacA s1/m1 (26 та) комбинациялари бошқа комбинацияларга нисбатан кўп учради.

Тошкент ҳудуди бўйича жами 112 та беморнинг 84 тасида (75%) CagA гени, 90 тасида (80,3%) VacA гени ва 89 тасида (79,5 %) IceA гени аниқланди. VacA генининг s1 типи s2 га қараганда 2,0 марта, m2 типи m1 типига қараганда 1,6 марта кўп учради. Худуд бўйича VacA генининг s/m типлари бўйича 13 та беморда коинфекция аниқланди. IceA1 аллели IceA2 аллелига қараганда 2,74 марта кўп учраган бўлиб, 18 та (16,1 %) беморда IceA1/IceA2 аллелларига эга бактерия изолятларининг коинфекцияси аниқланди.

Наманган ҳудудида яшовчи 22 та беморларнинг барчасида *H. pylori* CagA, IceA вирулент генлари аниқланди. IceA1 аллели IceA2 аллелига қараганда 6,3 марта кўп учради ҳамда 2 та (9,1%) беморда IceA1/IceA2 аллелларига эга коинфекция аниқланди. VacA гени 20 та (91 %) беморлардан олинган изолятларда аниқланди. VacA s1 типи s2 типига қараганда 9 баробар кўп, VacA m2 типи m1 типига қараганда 1,5 марта кўп учради.

VacA генининг s1/m2 генотиби 10 та, s1/m1 6та, s2/m1 1та намунада учраган бўлса, s2/m2 генотиби бирорта намунада кузатилмаган ҳамда 3 та беморларда (№ 8, 9, 17) (13,6%) коинфекция кузатилган (3-расм). Бундан ташқари айрим беморларда (№ 4, 8, 14) *H. pylori* колонияси кўплигини кўриш мумкин. Ўрганилган жами 110 та *H. pylori* VacA гени аниқланган беморларнинг 16 тасида (14,5%) VacA генининг s/m типлари бўйича коинфекция аниқланди. Айнан коинфекция ҳудудда юқори даражада инфекцияланганлигини билдиради. Ушбу беморларга гастрит ва ўн икки бармоқли ичак яраси ташхиси қўйилган.



**3-расм. Наманган вилоятида яшовчи гастроэнтерологик беморларда *H.pylori* бактерияси VacA генининг m- региони типлари. VacA m1-570 ж.н., m2- 645 ж.н. (ж.н.- жуфт нуклеотид).**

Жами 134 нафар гастроэнтерологик беморлар 4 та гуруҳга ажратиб олинди ва *H.pylori* вирулент генлари бўйича генотипланди. 37 та беморга ошқозон саратони (ОС), 42 та беморга гастрит, 31 та беморга ошқозон ва ўн икки бармоқли ичак яраси (ОЎИБИЯ), 24 та беморга ярали колит (ЯК) ташхиси қўйилган.

Умумий гуруҳдаги (УГ) 134 нафар гастроэнтерологик беморларда шартли соғлом инсонларга нисбатан CagA гени 3,76 марта ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0003$ ; OR=3,76; 95%CI: 2,0-7,0), VacA гени 3,14 ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ; OR=3,14; 95%CI: 1,6-5,9), IceA гени 3,5 марта ( $\chi^2=14$ ;  $p=0,0001$ ; OR=3,5; 95%CI: 1,8-6,7) юқори касалликларни ривожланиш ҳавф омили эканлиги статистика жиҳатдан исботланди ва ушбу генларнинг ташхислаш самарадорлиги (AUC-классификатор) CagA 65 % (ўртача), VacA 71 % (яхши), IceA 70,5 %га (яхши) классификаторга эгаллиги аниқланди. Шунингдек, IceA1 аллели 3,3 ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0003$ ; OR=3,3; 95%CI: 1,8-6,0), VacA s1 типи 3,0 ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ; OR=3,0; 95%CI: 1,7-5,5), VacA m1 типи 2,7 ( $\chi^2=9,2$ ;  $p=0,001$ ; OR= 2,7; 95%CI 1,4-5,2), m2 типи эса 2,2 марта ( $\chi^2=7,1$ ;  $p=0,004$ ; OR=2,2; 95%CI 1,2-4,1) касалликнинг ривожланиш ҳавф фактори эканлиги аниқланди (1, 2-жадваллар). УГда назоратга нисбатан VacA s1/m1 генотип 2,9 марта ( $\chi^2=7,6$ ;  $p=0,002$ ; OR=2,9; 95%CI 1,4-6,8), VacA s1/m2 генотиби 5,6 марта ( $\chi^2=16,1$ ;  $p<0,0001$ ; OR=5,6; 95%CI 2,4-15,1) юқори касалликнинг ривожланиш ҳавф фактори эканлиги аниқланди. УГда назоратга нисбатан касалликлар ривожланиш ҳавфини CagA+VacAs1/m1 генотиби 2,8 марта ( $\chi^2=7,0$ ;  $p=0,004$ ; OR=2,8; 95%CI 1,3-6,5) ва CagA+VacAs1/m2 генотиби 2,87 марта ( $\chi^2=8,4$ ;  $p=0,002$ ; OR=2,87; 95%CI 1,4-6,2) ошириши тасдиқланди. VacA генининг m2 типи ва IceA1 аллелининг ташхислаш самарадорлиги тегишлича 76,7 ва 70,5 % (яхши классификатор) эканлиги статистик жиҳатдан исботланди.

37 нафар ошқозон саратони (ОС) ташхиси қўйилган беморларнинг 31 тасида (84 %) CagA+, 24та (64,8 %) VacA, 21та (56,7 %) IceA аниқланган бўлиб, назоратга нисбатан касаллик ҳавфини CagA 5,1 ( $\chi^2=12$ ;  $p=0,003$ ; OR=5,1; 95%CI 1,97-11), VacA 1,3 марта кўп ривожлантириши тасдиқланди.

IceA1 аллели IceA2 аллелига нисбатан 9,5 марта кўп учраб, назоратга нисбатан касаллик ҳавфини 2,3 марта ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,3; 95% CI 1,0-5,1) кўп юзага келтириши аниқланди. ОСда VacA s1 типи s2 типига қараганда 7, m1 типи m2 га қараганда 2,6 марта кўп аниқланган бўлиб, ОСни ривожлантириш ҳавфини s1 2,2 ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,2; 95% CI 1,0-5,0), m1 2,8 марта ( $\chi^2=6,0$ ;  $p=0,007$ ; OR=2,8; 95% CI 1,2-6,7) ошириши тасдиқланди (1, 2- жадваллар).

1-жадвал.

**Шартли соғлом ва гастроэнтерологик беморларда *H.pylori* CagA, IceA генларининг учраши**

Касалликлар	CagA <sup>+</sup> , n (%)	IceA, n (%)	IceA1 <sup>+</sup> , n (%)	IceA2 <sup>+</sup> , n (%)	IceA1 <sup>+</sup> /IceA2 <sup>+</sup> , n (%)
ОС, n=37	31 (83,8 %)*	21 (56,7 %)	19 (90,4 %)*	2 (6,5 %)	-
Гастрит, n=42	30 (71,4 %)*	38 (90,5 %)*	25 (65,7 %)*	13 (34,2 %)	10 (26,3 %)
ОЎИБИЯ, n=31	27 (87 %)*	28 (90,3 %)*	22 (78,6 %)*	6 (21,4 %)	4 (14,3 %)
ЯК, n=24	18 (75 %)*	24 (100 %)	15 (62,5 %)*	9 (37,5)	6 (25 %)
УГ: n=134	106 (79 %)*	111 (82,8 %)*	81 (73 %)*	30 (27 %)	20 (18 %)
Шартли соғлом, n=76	38, (50%)	44, (57,9%)	24, (54,5%)	20, (45,5%)	0

Изох: \* -  $p<0,05$ . ОС-Ошқозон саратони, ОЎИБИЯ-Ошқозон ўн икки бармоқли ичак яраси, ЯК-Ярали колит, УГ- Умумий гурух. n=сон.

ОСда назоратга нисбатан касаллик ҳавфини VacAs1/m1 генотиби 3,9 марта ( $\chi^2=8,6$ ;  $p=0,001$ ; OR=3,9; 95%CI 1,5-11,0) ҳамда шунга мос равишда CagA+VacAs1/m1 комбинацияси ОС ривожланиш ҳавфини 3,5 марта ( $\chi^2=6,9$ ;  $p=0,004$ ; OR=3,5; 95%CI 1,3-9,7) ошириши статистик жиҳатдан тасдиқланди. ОС билан бошқа генотиплар ва комбинациялар ўртасида ассоциация аниқланмади.

2-жадвал

**Шартли соғлом ва гастроэнтерологик беморларда VacA s ва m типларини тарқалиши**

Касалликлар	VacA+	VacAs1	VacAs2	VacAm1	VacAm2
ОС, n=31	24 (64,8 %)	21 (87,5%)*	3 (12,5 %)	16 (66,7%)*	6 (25 %)
Гастрит, n=42	40 (95,2 %)*	28 (70%)*	12 (30%)	17 (45,9 %)*	20 (54%)*
ОЎИБИЯ, n=31	29 (93,5%)*	21 (72,4%)*	8 (27,5%)	13 (38%)*	21 (62%)*
ЯК, n=24	24 (100%)	16 (66,7%)*	9 (37,5 %)	10 (37%)*	17 (63%)*
УГ, n=134	110 (82%)*	85 (72,6%)*	32 (27,3%)	56 (47%)*	64 (53%)*
Шартли соғлом, n=76	45, (59%)	28, (62%)	17, (38%)	16, (35,6 %)	22, (48,9 %)

Изох: \* -  $p<0,05$ . ОС-Ошқозон саратони, ОЎИБИЯ-Ошқозон ўн икки бармоқли ичак яраси, ЯК-Ярали колит, УГ- Умумий гурух. n=сон.

42 нафар гастрит ташхиси қўйилган беморларнинг 30 тасида (71,4%) CagA<sup>+</sup>, 40 та (95,2 %) VacA, 38 та (90,5%) IceA гени аниқланиб, назоратга

нисбатан касаллик ривожланиш ҳавфини CagA 2,5 марта ( $\chi^2=5,1$ ;  $p=0,012$ ; OR=2,5; 95% CI 1,1-5,7), IceA1 аллели 3,15 ( $\chi^2=8,7$ ;  $p=0,001$ ; OR=3,15; 95% CI 1,4-7,0), VacAs1 3,4 ( $\chi^2=9,65$ ;  $p=0,0009$ ; OR=3,4; 95% CI 1,5-7,6), m1 2,5 ( $\chi^2=5,0$ ;  $p=0,01$ ; OR=2,5; 95% CI 1,1-5,8), m2 типи 2,2 марта кўп ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,2; 95% CI 1,0-4,9) эканлиги маълум бўлди. 10 та (26,3 %) беморларда IceA1/IceA2 коинфекцияси кузатилди. VacA s1 типи s2 типига қараганда 1,75 марта кўп. (1, 2- жадваллар). Назоратга нисбатан гастрит касаллигининг ривожланиш ҳавфини VacA s1/m1 генотибли изолятлар 5,5 марта ( $\chi^2=14$ ;  $p<0,0001$ ; OR=5,5; 95% CI 2,9-14,0), VacA s1/m2 генотибли изолятлар 5,7 марта ( $\chi^2=12,4$ ;  $p=0,0002$ ; OR=5,7; 95% CI 2,0-14,0) касаллик ривожланиш ҳавфини оширади. Шунингдек, назоратга нисбатан гастритда касаллик ҳавфини CagA<sup>+</sup>+VacAs1/m1 3,3 ( $\chi^2=6,5$ ;  $p=0,005$ ; OR=3,3; 95% CI 1,3-8,9), CagA<sup>+</sup>+VacAs1/m2 2,9 мартага ( $\chi^2=5,7$ ;  $p=0,008$ ; OR=2,9; 95% CI 1,2-7,4) ошириши статистик жиҳатдан тасдиқланди.

Ошқозон ва ўн икки бармоқли ичак яраси (ОЎИБИЯ) тапхиси қўйилган 31 нафар беморлардан 27 тасида CagA<sup>+</sup>, 29 та VacA, 28 та IceA генлари аниқланган бўлиб, назоратга нисбатан CagA 6,6 ( $\chi^2=12,7$ ;  $p=0,0002$ ; OR=6,6; 95% CI 2,2-12), VacA 9,8 ( $\chi^2=12,2$ ;  $p=0,0002$ ; OR=9,8; 95% CI 2,5-21,0) касалликнинг ривожланиш ҳавфи омили эканлиги маълум бўлди. ОЎИБИЯда IceA1 аллели назоратга нисбатан 5,2 ( $\chi^2=14$ ;  $p=0,0009$ ; OR=5,2; 95% CI 2,1-13), VacAs1 2,2 ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,2; CI 1,0-5,0), m1 2,7 ( $\chi^2=4,8$ ;  $p=0,01$ ; OR=2,7; 95% CI 1,1-6,7) ва m2 5,0 марта ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ; OR=5,0; 95% CI 2,1-12) марта юқори касаллик ривожланиш ҳавфи омили эканлиги маълум бўлди. Беморларда m2 типи m1 типига қараганда 1,6 марта кўп аниқланди. 4 та (14,3 %) беморда IceA1/IceA2 аллелларига эга коинфекция аниқланди (1, 2- жадваллар). ОЎИБИЯда назоратга нисбатан VacA s1/m2 генотибли 12,0 марта ( $\chi^2=21$ ;  $p<0,0001$ ; OR=12,0; 95% CI 4,1-19,0), CagA/VacAs1/m2 генотибли изолятлар 6,2 марта ( $\chi^2=14$ ;  $p<0,0001$ ; OR=6,2; 95% CI 2,4-15,0) касалликнинг ривожланиш ҳавфи омили эканлиги статистик жиҳатдан тасдиқланди.

24 нафар беморга ярали колит (ЯК) тапхиси қўйилган бўлиб, шундан 18 та (75 %) CagA<sup>+</sup>, 24 та (100%) VacA аниқланган бўлиб, ЯКда назоратга нисбатан CagA 2,9 марта ( $\chi^2=4,6$ ;  $p=0,01$ ; OR=2,9; CI 1,0-8,9); s1 3,4 марта ( $\chi^2=6,5$ ;  $p=0,005$ ; OR=3,4; 95% CI 1,3-9,4), m1 2,6 марта ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,6; 95% CI 1,0-7,1) ва m2 5,8 марта ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ; OR=5,8; 95% CI 2,2-13) юқори касалликнинг ривожланиш ҳавфини юзага келтириши статистик жиҳатдан тасдиқланди. ЯКда VacA s1 типи s2 типига қараганда 1,77 марта, m2 типи m1 типига қараганда 1,7 марта кўп учради. ЯК беморларнинг барчасида IceA гени аниқланган бўлиб, IceA1 аллели IceA2 алелига нисбатан 1,67 марта кўп. бта (25%) беморда IceA1/IceA2 комбинацияси аниқланди. ЯКда назоратга нисбатан IceA1 аллели 3,5 марта ( $\chi^2=7,3$ ;  $p=0,003$ ; OR=3,5; 95% CI 1,37-9,6) касаллик ривожланиш ҳавфи эканлиги исботланди (1, 2- жадваллар). ЯКда назоратга нисбатан VacA s1/m1 3,0 марта ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ; OR=3,0; 95% CI 1,0-9,5), VacAs1/m2 5,7 марта ( $\chi^2=9,8$ ;  $p=0,0009$ ; OR=5,7; 95% CI 1,7-20,0) касалликнинг ривожланиш ҳавфи омили сифатида статистик жиҳатдан исботланди. Шунингдек, ЯКда назоратга нисбатан

CagA/VacAs1/m1 генотиби 3,0 марта ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ; OR=3,0; 95%CI 1,0-9,5) ва CagA/VacAs1/m2 генотиби 2,9 марта ( $\chi^2=4,2$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,9; 95%CI 1,0-8,6) юқори касаллик ривожланиш ҳавф омили эканлиги тасдиқланди.

Ташхислаш самарадорлиги (AUC-классификатор) бўйича CagA гени барча касалликларда ўртача кўрсаткиччи (61-68 %), VacA ва IceA генлари УГ, Гастрит, ОЎИБИЯ, ЯК касалликларда яхши (71-79,6%), умумий гуруҳда VacA m2 типи 76,7 %да яхши классификаторни намоён қилди. Бу эса CagA, VacA ва IceA генларини касалликларни ташхислашда маркер ген сифатида олиш мумкинлигини билдиради. Лекин баъзи намуналарда VacA s ёки m регионлари аниқланмагани боис уларнинг ҳавф даражаси кам чиқди. Бу эса маҳаллий изолятларда маркер генларнинг праймерлар бирикадиган сайтида ўзгариш мавжудлигини аниқлатади ҳамда уларни аниқлаш учун маҳаллий изолятларнинг маркер генлари нуклеотидлар кетма-кетлигини ўрганиш муҳумлигини кўрсатади.

Гастроэнтерологик касалликларда VacA s/m регионларининг s1/m1 (38 та), s1/m2 (44 та) комбинациялари s2/m1 (12 та), s2/m2 (16 та) комбинацияларига қараганда кўплиги аниқланди. ОС, Гастрит, ЯК, УГда VacA s1/m1 генотиби, Гастрит, ОЎИБИЯ, УГда VacA s1/m2 генотиби билан ассоциацияда эканлиги аниқланди ( $p<0,05$ ) (3-жадвал).

3-жадвал

**Гастроэнтерологик касалликларда *H.pylori* VacA гени s ва m типларининг комбинацияларини биргаликда учраши**

Касалликлар	VacA+, n	VacA+, n							
		s1/ m1	s1/ m2	s2/ m1	s2/ m2	s1/ m0	s2/ m0	s0/ m1	s0/ m2
ОС, n=37	24	13*	6	3	-	2	-	-	-
Гастрит, n=42	40	13*	14*	3	5	1	4	1	1
ОЎИБИЯ, n=31	29	5	16*	5	3	-	-	3	2
ЯК, n=24	24	7*	8*	1	5	5	-	-	2
УГ, n=134	110	38*	44*	12	13	8	3	4	6
Шартли соғлом, n=76	45	9	7	6	10	13	-	-	6

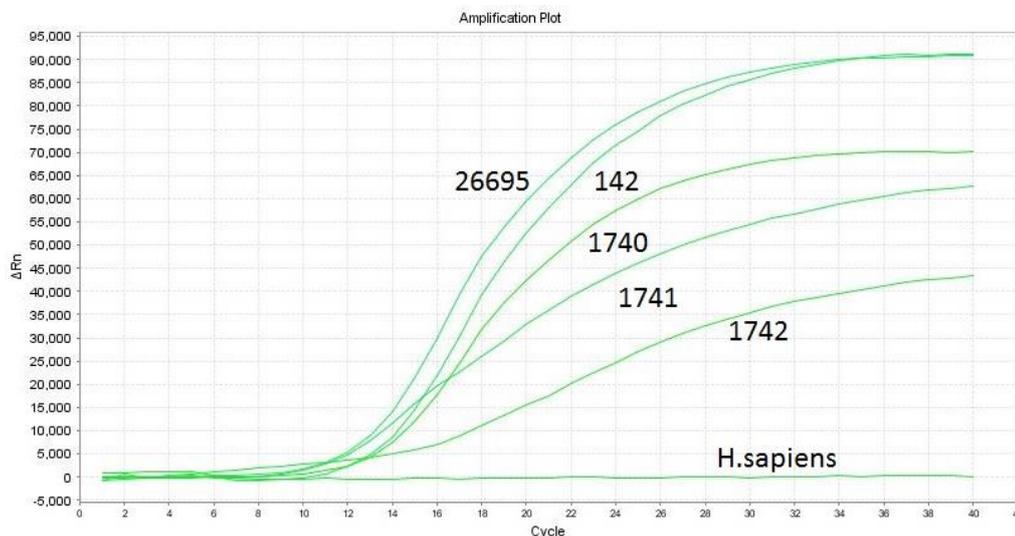
Изох: \* -  $p<0,05$ . ОС-Ошқозон саратони, ОЎИБИЯ-Ошқозон ўн икки бармоқли ичак яраси, ЯК-Ярали колит, УГ- Умумий гуруҳ. n=сон.

CagA ва VacA генининг s/m типлари билан касалликлар ўртасидаги комбинация ўрганилганда CagA/VacAs1/m1 генотиби ОС, Гастрит, ЯК, УГ беморларида, CagA/VacAs1/m2 генотиби гастрит, ОЎИБИЯ, ЯК, УГ беморларида касаллик билан ассоциацияда бўлганлиги статистик жиҳатдан аниқланди ( $p<0,05$ ).

Шундай қилиб, гастроэнтерологик касалликлар билан *H.pylori* CagA, VacA s1, m1, m2/ IceA1 вирулент генлари ўртасида ассоциация аниқланди ва ушбу

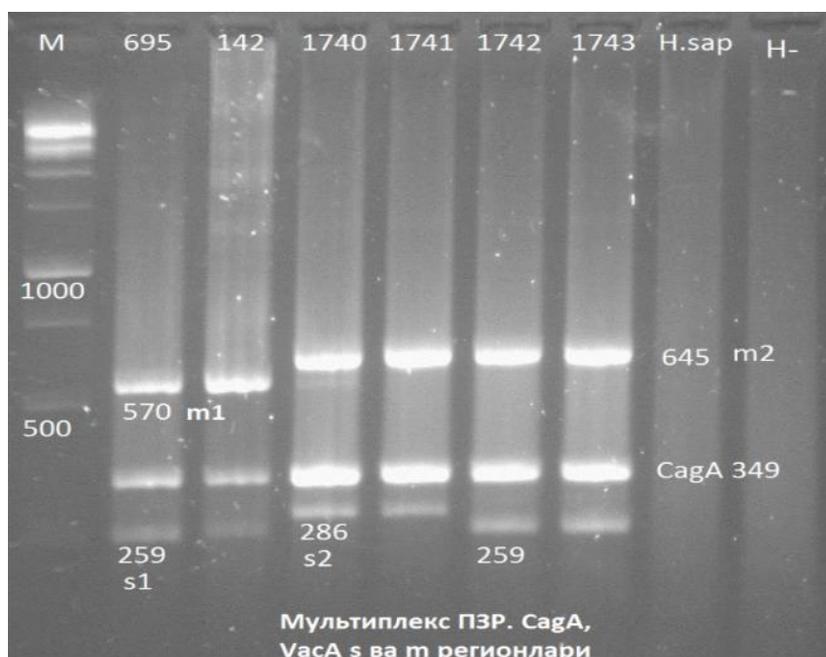
генларга эга изолятлар аниқланса антибактериял терапия қўлланилиши керак.

Кўпгина клиникаларда Real-Time PCR амплификатори мавжудлиги сабабли *H.pylori* CagA генини аниқлашда Айни вақтдаги ПЗР (Real-Time PCR) реакцияси ишлаб чиқилди. Барча маҳаллий *H.pylori* культурал намуналарда CagA гени мавжудлиги тасдиқланди (4-расм).



4- расм. Айни вақтдаги ПЗР методи ёрдамида *H.pylori* CagA генини амплификация графиги

Диссертация тадқиқотида CagA VacA s, VacA m регионларини идентификациялаш учун мультиплекс ПЗР методи ишлаб чиқилди (5-расм).



5- расм. *H.pylori* CagA, VacA s, m- регионларини мультиплекс ПЗР амплификация маҳсулоти. 2 %ли агарозали гель электрофорез. 695 -26695, 142, 1740, 1741, 1742, 1743 ПЗР амплификация маҳсулоти, *H.sapiens* (одам) нинг веноз қони ДНКси ва Н-манфий назорат (сув). CagA – 349 ж.н., VacA s1-259 ж.н., s2-286 ж.н., VacA m1-570 ж.н., VacA m2-645 ж.н. (жупт нуклеотид).





VacA оқили филогенетик қиёсий таҳлил қилинганда 132 ва 142 маҳаллий изолятларда ўхшашлик 99% бўлса, 1749 изоляти 132 ва 142 изолятларидан фарқ қилиши аниқланди.

PylPhen-2, prediction protein дастурлари ёрдамида аминокислоталар кетма-кетлигидаги ўзгаришлар оқилнинг фаоллигига ва ҳужайрага таъсири назарий жиҳатдан ўрганилди. Мутацияларнинг аксарияти (29 таси) VacA оқилининг р33 суббирлигида жойлашганлиги аниқланди. Р33 суббирлигининг ион канал формалаштириш сайтида (1-32 аминокислоталар оралиғида) 19- аминокислота треонин ўрнига 132 ва 142 изолятларда аланин аминокислотаси жойлашган. Олигомерланиш сайтида (49-57 аминокислоталар оралиғида) 55- аминокислота лизин ўрнига 132 ва 142 изолятларида аргенин жойлашган. р33 ва р55 суббирликларининг ўзаро боғланадиган сайтнинг 328-аминокислотаси аспарагин ўрнига аспарагин кислота ва 340- трионин ёки аланин ўрнига глицин ўрин алмашган. Оқил секрецияси ва фолдингга жавоб берувчи сайтнинг 623- глутамин ўрнига тирозин ўрин алмашган. VacA р33 суббирлигида 216- аминокислотадан сўнг учта аминокислота (Серин, Аспарагин, Гистидин) инсерцияси мавжуд. Шунингдек, р55 сбирлигида ҳам мутациялар аниқланган бўлиб, аксарияти суббирликнинг бошланиш қисмида (312-460 аминокислоталар оралиғида) бўлиб, ушбу сайт ҳўжайин эпителиал ҳужайралари плазматик мембранаси рецепторлари билан боғланиши келтирилган.

Балки ушбу мутациялар оқилнинг экспрециясига, токсиклик фаоллигига таъсир қилиши ҳамда токсинни турли хил ҳужайра рецепторларига боғлана олиш хусусиятини, шунингдек плазматик мембранада канал ҳосил қилиш ва митондрияни ичига киришини кучайтириши мумкин.

Маҳаллий 132, 142 ва 1749 *H.pylori* VacA оқилининг i-региони дунё штампларини ушбу региони билан таққосланди. 1749 маҳаллий изолятининг VacA генида i1-региони аниқланган бўлса, 132 ва 142 маҳаллий изолятларда i3-региони аниқланди (4- жадвал).

#### 4- жадвал

##### VacA оқили i-региони аминокислоталарининг полиморфизмлари

i-регион	A кластер	B кластер	C кластер	Адабиётлар
i1	SADRTTRVDFN	QASEGITSSK	ASNS--- VKLNGN	206; 926–936-б
	SADRTTRVDFN	QASE.ITS	AS.---SV	59; 690–696-б
	SADRTTRVDFN	QASEGITS.K	ASNS---VKLMGN	120; 101–110-б
i1_1749_Uz	SADRTTRVDFN	QASEGITSSK	ASSS---VKLMGN	Маҳаллий изолят
i2	GANRTTRVNFD	KSSEKITSRE	VSSSNQSVAIYGK	206; 926–936-б
	GANRTTRVNFD	KSSEKITSRE	VSSSN.SVAIYEK	59; 690–696-б
	GANRTTRVDFN	QASEKITSRE	VSSSNHSAIYGK	120; 101–110-б
i3_i1	SADRTTRVDFN	QASEGITS.K	ASNS--- VKLMGN	120; 101–110-б
i3_i2	GANRTTRVDFN	QASEKITSRE	VSSSNHSAIYGK	
i3_142_Uz	GANRTTRVDFN	QASEKITSRE	VQSSNHSTKLYGK	Маҳаллий изолят
I3_132_Uz	GANRTTRVDFN	QASEKITSRG	VQSSNHSTKLYGK	

VacA i-региони таҳлил қилинганда, 132 изолятининг VacA гени i3-регионининг B-кластерида E-Глутамин кислота ёки K-лизин аминокислота ўрнига G-Глицин аминокислота, 132 ва 142 изолятларда i-регионининг C-кластерида S-серин ўрнига Q- Глутамин аминокислотаси ўрин алмашган. 1749 изолятида i-регионининг C-кластерида N- Аспарагин ўрнига S-серин аминокислотаси ўрин алмашган.

Ушбу мутациялар маҳаллий изолятлар учун специфик бўлиши ва VacA оқсилени вирулентлигини ошириши мумкин.

VacA генини i1 типи i2 типига қараганда токсиклиги юқорили маълум лекин i3 типига эга изолятлар жуда кам штаммларда учраши ва i1, i2 типларининг химери натижсида пайдо бўлганлиги келтирилган ҳамда вирулентлик даражаси яхши ўрганилмаган. i1 типига эга штаммлар турли хужайраларни вакуолизацияга учратган бўлса, i2 типига эга штаммлар фақат маълум типдаги хужайраларни вакуолизацияга олиб келган.

*H.pylori* вирулентлигини аниқлаш учун ПЗР тест генотиплаш системасига VacA генининг s-, m- регионлари билан бирга i- регионини ҳам аниқлашни киритиш муҳимлигини англатади.

## ХУЛОСАЛАР

1. Тошкент ва Наманган худудларида тарқалган *H.pylori* изолятлари вирулент генлари бўйича генотипланди. Вирулент генетик вариантларнинг юқори даражаси аниқланди, CagA гени 79,1 % ҳолатда, VacA генининг s1 варианти s2 вариантга қараганда 2,65 марта кўп аниқланган бўлса, m1 ва m2 типларининг (56/64) учраши ўртасида деярли фарқ йўқ, IceA1 аллели IceA2 аллелга қараганда 2,7 марта кўп учраши аниқланди.

2. Барча ошқозон-ичак касалликлари билан IceA1 аллелининг ассоциацияси аниқланди (OR: 3,3; 95%CI 1,8-6,0; p=0,0001). CagA/VacA s1/m1 генотиби ошқозон саратони билан (OR:3,5; 95%CI 1.3-9.7; p=0,004) ва CagA/VacA s1/m2 генотиби ошқозонни ва ўн икки бармоқли ичак яраси касалликлари билан юқори даражада (OR:6,2; 95%CI 2.4-15,0; p<0,001) ассоциацияланган. CagA (AUC=65%), VacA (AUC=71%), IceA (AUC=70,5%) вирулент генларини ошқозон-ичак касалликларини ташхислаш панелига киритиш мумкин.

3. CagA генини аниқлаш учун Real-Time PCR ҳамда CagA ва VacA генини генотиплаш учун мультиплекс ПЗР методлари ишлаб чиқилди, шунинг натижасида 3 баробар иқтисодий самарадорликка эришилди.

4. Илк бор Марказий Осиёда маҳаллий *H.pylori* бактериясининг VacA гени секвенс қилинди. Филогенетик таҳлилга кўра, Ўзбекистон худудида турли хил изолятлар мавжудлиги ва маҳаллий изолятлар дунё штаммларидан алоҳида кластерда жойлашганлиги аниқланди.

5. VacA генидаги ўзгаришлар маҳаллий *H.pylori* изолятларда VacA оқсилени экспрессия даражасига, токсинни ошқозон эпителиал хужайрасининг турли хил рецепторларига боғлана олиш хусусияти, шунингдек плазматик мембранада канал ҳосил қилиш ва митохондрияни ичига киришини кучайтириши мумкин.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.29.12.2018.V.01.13 ПО  
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ИНСТИТУТА БИОФИЗИКИ  
И БИОХИМИИ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ  
УЗБЕКИСТАНА**

---

**ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ**

**АБДУРАХИМОВ АБРОРЖОН АКРАМОВИЧ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ  
БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI***

**03.00.01 – Биохимия, 03.00.03 - Молекулярная биология. Молекулярная генетика.  
Молекулярная биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам**

**Ташкент-2019**

**Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2018.4.PhD/B144.**

Диссертация выполнена в Институте Биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета [www.ibb-nuu.uz](http://www.ibb-nuu.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)).

<b>Научный руководитель:</b>	<b>Турдикулова Шахлохон Уткуровна</b> доктор биологических наук
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Абдуллаев Алишер Абдумавлянович</b> доктор биологических наук <b>Далимова Сурайё Нугмановна</b> доктор биологических наук, профессор
<b>Ведущая организация:</b>	<b>Центр Геномика и биоинформатика</b>

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_ часов на заседании разового Научного совета DSc.29.12.2018.B.01.13 при Институте Биофизики и биохимии, Национальном университете Узбекистана. Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, улица Университетская, 174. (Здание факультета химии Национального университета Узбекистана, 4-й этаж). Тел.: (+99871) 246-68-96.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института Биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана (зарегистрировано под № \_\_\_\_\_). Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, Университетская, 174. Тел.: (+99871) 246-68-96, e-mail: [ibb-nuu@mail.ru](mailto:ibb-nuu@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан: «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.  
(реестр протокола рассылки № «\_\_\_\_\_» от «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019).

**Сабиров Равшан Заирович**  
Председатель разового Научного совета по присуждению  
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

**Асраров Музаффар Исламович**  
Ученый секретарь разового Научного совета по  
Присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

**Шеримбетов Санжар Гулмирзоевич**  
Председатель разового Научного семинара при Научном совете  
по присуждению ученых степеней, д.б.н.

## ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** В настоящее время больше половины населения мира инфицировано бактерией *Helicobacter pylori*, но только некоторые штаммы способны вызывать заболевания желудочно-кишечного тракта. При возникновении этих болезней большое значение имеют образ жизни, наследственность, питание, вредные привычки и степень патогенности самой бактерии. Доказано, что 62 вирулентных гена в геноме *H.pylori* проявляют патогенные свойства. По сведениям Всемирной Организации Здравоохранения, в мире каждый год регистрируется около 7 миллионов случаев заболеваний желудочно-кишечного тракта и в результате этих болезней наблюдаются сотни тысяч случаев летального исхода<sup>4</sup>. В Узбекистане в 2017 году было зарегистрировано 13,4 % случаев заболеваемости ЖКТ, это занимает второе место среди всех болезней<sup>5</sup>. Отмечена важность выявления наличия *H.pylori* и определения степени патогенности для профилактики и лечения данных заболеваний.

В исследованиях, проводимых крупными научными центрами по всему миру, выявлено воздействие бактерии *H.pylori* на эпителиальные клетки желудка и связь степени патогенности бактерии с ее вирулентными генами. Также, приводятся данные о важности скрининга распространенности бактерии по регионам, специфичных изменений местных изолятов и ассоциации с заболеваниями. В результате, разрабатываются тест системы, определяющие патогенные штаммы для каждого региона.

В нашей стране разработаны современные методы скрининга бактерии *H.pylori* при желудочно-кишечных заболеваниях. На основе мероприятий по этому направлению удалось повысить эффективность лечения гастроэнтерологических заболеваний. В стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан, определены задачи по “Созданию эффективных механизмов поощрения инновационной и научно-исследовательской деятельности, внедрению инновационных и научно-исследовательских достижений в практику” и “Совершенствованию системы здравоохранения и социальной защиты населения”<sup>6</sup>. В связи с этим, важную роль играет разработка подходящих для этого региона тест-систем, путем определения специфических особенностей маркерных генов в местных штаммах бактерии *H.pylori*, определение степени патогенности, ранней диагностики, а также внедрение молекулярно-генетических методов исследований.

Данная диссертационная работа в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в соответствии с Указом Президента Республики Узбекистан № УП-4947 «О стратегии действий по пяти приоритетным направлениям развития Республики Узбекистан в 2017-2021

<sup>4</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/ru>

<sup>5</sup> <http://stat.uz/uploads/docs/zdravoxraneniya-2017-uz.pdf>

<sup>6</sup> Указ Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г. № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан»

годах» от 7 февраля 2017 года, и в Постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему развитию специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан на 2017-2021 года» от 20 июня 2017 года, а также других нормативно-правовых документах принятых в данной сфере.

**Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий в Республике.** Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

**Степень изученности проблемы.** Австралийскими учеными было выявлено участие (Marshall B.J., Warren J.R.,1984) *H.pylori* в развитии желудочно-кишечных заболеваний. Исследовано отрицательное влияние бактерии *H.pylori* на эпителиальные клетки желудка (Atherton J. 1995; Cover T. 2005; Fahimi 2017), молекулярно-генетические и биохимические свойства вирулентных генов VacA, CagA и IceA (Yamaoka Y, 1999; Wroblewski L.E., 2010). Учеными США (Tomb J.F. и др.1997) просеквенирован геном бактерии. Группой китайских ученых (Hooi J. и др., 2017) проведено генотипирование изолятов бактерии *H.pylori*, распространенных на территории Казахстана.

В странах СНГ Момыналиев К.Т. (2009), Антонова О.С., Белов Ю.В. (2010) и Татаренко Д.П. (2016) исследовали распространение *H.pylori* на территории России и ее взаимосвязь с заболеваниями.

В Узбекистане Баженовым Л.Г. (1998) микробиологическими методами, Х.А.Ибрагимовым (2011) на территории Приаралья молекулярно-генетическими методами, Абдиевым С. (2010), на основе иммуноферментного анализа, Хегай Т.Р. (2014) методом мультилокусного сиквенса выявлена распространенность бактериальной инфекции. В приведенных выше результатах в недостаточной степени отражены данные по распространению бактерии *H.pylori* в нашей республике и их ассоциации с гастроэнтерологическими заболеваниями. Также, не секвенирован вирулентный ген VacA штаммов бактерии *H.pylori*, распространенных на территории Средней Азии.

**Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация.** Диссертационное исследование выполнено в институте Биофизики и биохимии в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментального проекта ФА-Ф4-Т106 (2007-2011 г). «Изучение генетического разнообразия *Helicobacter pylori* в Узбекистане с использованием технологии биочипов и мультилокусного секвенирования» и прикладного молодежного проекта института Биоорганической химии ЁА 10-ФА-Т039 (2015-2017г) «Разработка тест-методики определения резистентности *H.pylori* к антибиотикам методом ПЦР в реальном времени».

**Целью исследования** является определение генетических факторов бактерии *H.pylori*, ассоциированных с гастроэнтерологическими заболеваниями.

### **Задачи исследования:**

создание банка биологических образцов ДНК *H.pylori* различных гастроэнтерологических больных, инфицированных *H.pylori*;

определение распространения вирулентных генов CagA, VacA, IceA бактерии *H.pylori* и ассоциаций с гастроэнтерологическими заболеваниями;

определение степени риска вирулентных генов в развитии гастроэнтерологических заболеваний;

усовершенствование метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) определения вирулентных генов бактерии *H.pylori*;

определение первичной структуры нуклеотидной последовательности и проведение молекулярно-биохимического анализа гена VacA местного изолята *H.pylori*.

**Объектом исследования** являлись образцы ДНК клинических изолятов *H.pylori*, в качестве контрольного штамма использован HP-26695 штамм *H.pylori* из коллекции АТСС (коллекция Американских штаммов и тканей).

**Предметом исследования** являлось определение вирулентных генов CagA, VacA, IceA и их вариантов, усовершенствование метода ПЦР.

**Методы исследования.** При проведении исследований использованы методы центрифугирования, выделения нуклеиновых кислот, спектрофотометрии, амплификации генов, гель-электрофореза, секвенирования, а также биоинформатические и статистические программы.

**Научная новизна исследования** состоит в следующем:

определена частота распространения вирулентных генов CagA, IceA и VacA бактерии *H.pylori*, а также ассоциация генов CagA, IceA1 и типов s1/m1/m2 гена VacA с гастроэнтерологическими заболеваниями;

разработан метод мультиплексной ПЦР для генотипирования вирулентных генов CagA и VacA;

разработан метод Real-time PCR определения гена CagA;

на основе секвенирования гена VacA изолятов бактерии *H.pylori* выявленной на территории Узбекистана определены ранее неопознанные нуклеотидные мутации и доказано, что данные мутации встречаются только у местных изолятов, тем самым они отличаются от других мировых штаммов.

**Практические результаты исследования** заключаются в следующем:

доказана возможность определения патогенных изолятов бактерии *H.pylori* в желудочном соке в кратчайшие сроки молекулярно-генетическими методами;

разработаны методы мультиплексной ПЦР и Real-time PCR определения патогенных изолятов бактерии *H.pylori*;

выявлено, что изоляты бактерии с генотипами CagA, IceA1, VacA s1/m1/m2 обладают высокой патогенностью;

определена первичная структура гена VacA местных изолятов *H.pylori*.

**Достоверность результатов исследования** подтверждается тем, что они получены с применением современных биохимических, молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов. Научные результаты

анализировались тестом Фишера  $\chi^2$ , статистическая достоверность выражена в  $P < 0,05$ . Результаты секвенирования сравнены с данными NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Все полученные научные данные подтверждаются публикациями в рецензируемых научных журналах и обсуждением на конференциях республиканского и международного уровня.

#### **Научная и практическая значимость результатов исследования.**

Научная значимость результатов исследования заключается в том, что проведен отбор генов-кандидатов идентификации патогенных изолятов бактерии *H.pylori*, разработан метод мультиплексной ПЦР для одновременного определения вирулентных генов *VacA* и *CagA* *H.pylori*, а также Real-Time PCR для определения гена *CagA*, создан дизайн специфичных праймеров для сиквенса гена *VacA*, на основе полученных результатов по секвенированию гена *VacA* доказано, что местные изоляты отличаются от мировых штаммов.

Практическая значимость полученных результатов исследования заключается в том, что они могут служить основным материалом при определении патогенных штаммов, используя методы мультиплексной ПЦР, Real-Time PCR в медицинских клиниках Узбекистана можно определить изоляты бактерии *H.pylori*. Полученные результаты сиквенса гена *VacA* будут основой для разработки специфичной ПЦР-тест системы для определения вирулентности бактерий местных изолятов.

**Внедрение результатов исследования.** На основе полученных результатов по секвенированию гена *VacA*, генотипированию вирулентных маркеров генов *CagA*, *VacA*, *IceA* местного изолята бактерии *H.pylori*:

использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в фундаментальном проекте под номером ФА-Ф6-Т219 “Изучение влияния бактериоциноподобных веществ, продуцируемых местными штаммами *Lactobacillus casei group* на *Helicobacter pylori*, возбудителя язвенных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки человека” при идентификации местных культур *H.pylori* (справка № 4/1255-586 Академии наук Республики Узбекистан от 4 марта 2019 г.). В результате, достигнута возможность высокой специфичности определения культур бактерии, а также выявление непатогенных и патогенных штаммов;

усовершенствованный метод мультиплексной ПЦР использован в фундаментальном проекте под номером ФА-Ф6-Т219 “Изучение влияния бактериоциноподобных веществ, продуцируемых местными штаммами *Lactobacillus casei group* на *Helicobacter pylori*, возбудителя язвенных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки человека” при определении непатогенных и патогенных культур бактерии (справка № 4/1255-586 Академии Наук Республики Узбекистан от 4 марта 2019 г.). В результате определения культур бактерий достигнута экономическая эффективность за счет экономии расхода реактивов в 3 раза;

нуклеотидная (KY779729.1, KY779730.1) и аминокислотная (AVH78333.1, AVH78334.1) последовательности гена *VacA* местных

изолятов 142 и 1749 бактерии *H.pylori* введены в базу данных NCBI и ENA. (Справка Университета Калифорнии от 17 января 2019 года). В результате создана возможность определения специфичности изолятов бактерии *H.pylori*, распространенных на территории Узбекистана, а также сравнения данных сиквенса со штаммами, встречаемыми на разных континентах мира.

**Апробация результатов исследования.** Результаты исследования прошли апробацию на 6 международных и 13 республиканских научно-практических конференциях.

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано всего 25 печатных работ, из них 6 научных статей, в том числе 4 – в республиканских и 2 – в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

**Структура и объем диссертации.** Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы и приложения. Объем диссертации составляет 116 страниц.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

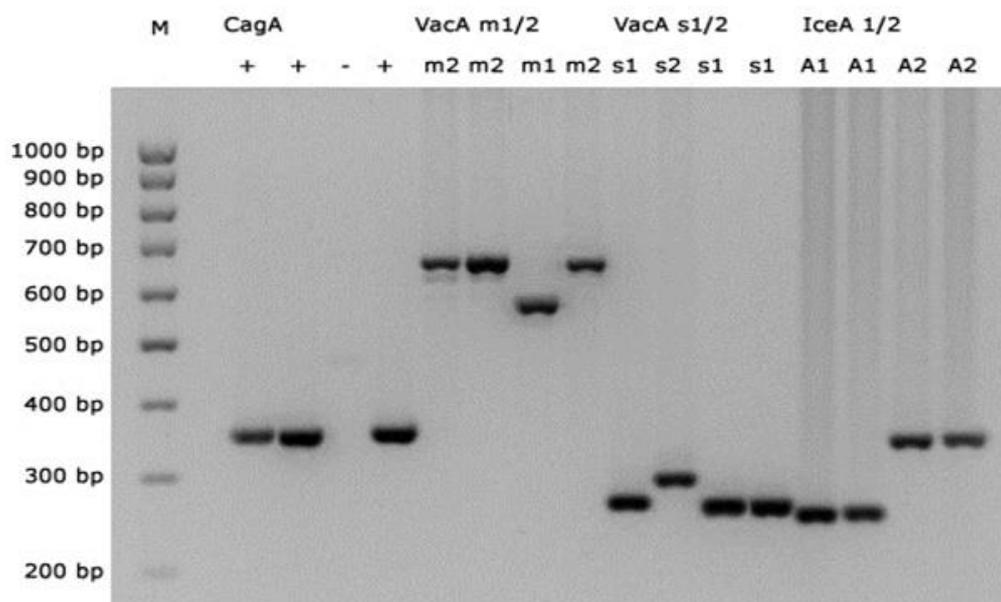
**Во введении** обоснована актуальность и востребованность темы диссертации, сформированы цели и задачи, а также объект и предмет исследования, приведено соответствие исследований приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, изложены научная новизна и практические результаты исследований, раскрыты теоретическая и практическая значимость полученных результатов, даны сведения о внедрении результатов исследований в практическую медицину, опубликованных работах и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Общая характеристика бактерии *Helicobacter pylori***» приведен всесторонний анализ, дана научная оценка состояния проблемы. В данной главе представлен обзор литературы, где раскрываются история открытия, распространение инфекции, биология, патогенные свойства и современные методы изучения бактерии *H.pylori*. По генетике *Helicobacter pylori* рассмотрены структура и функции генов *VacA*, *CagA* и *IceA*.

Во второй главе диссертации «**Современные методы, использованные при идентификации бактерии *Helicobacter pylori***» освещены этапы исследований, материал и методы исследования. В частности, исследованы 134 больных, в возрасте от 16 до 75 лет (средний 46±1,5) с гастроэнтерологическими заболеваниями, проживающие на территории Узбекистана, а также 76 условно здоровых лиц. Кроме этого, в качестве объекта исследования были взяты местные изоляты Hp132, Hp142, Hp1740, Hp1741, Hp1742, Hp1743 и Hp1749 бактерии *H.pylori*. При выполнении исследования были применены следующие методы: выделение ДНК, гель-электрофорез, спектрофотометрия, полимеразно-цепная реакция (ПЦР), флуориметрия, секвенирование, а также биоинформатические и статистические программы.

В третьей главе диссертации «Генотипирование по вирулентным генам бактерии *Helicobacter pylori* и изучение взаимосвязи с заболеваниями желудочно-кишечного тракта» освещены результаты анализа частоты встречаемости вирулентных генов CagA, VacA, IceA бактерии *H.pylori* и изучена ассоциация этих генов с заболеваниями.

ПЦР была проведена с целью генотипирования по аллелям гена IceA, а также по типам s и m гена VacA, основного вирулентного гена CagA бактерии *H.pylori*. Продукт амплификации ПЦР, в соответствии с базой данных, составил CagA 349, VacA s1 259, s2 286, m1 570, m2 645, IceA1 247 и IceA2 334 пар нуклеотидов (рис. 1).



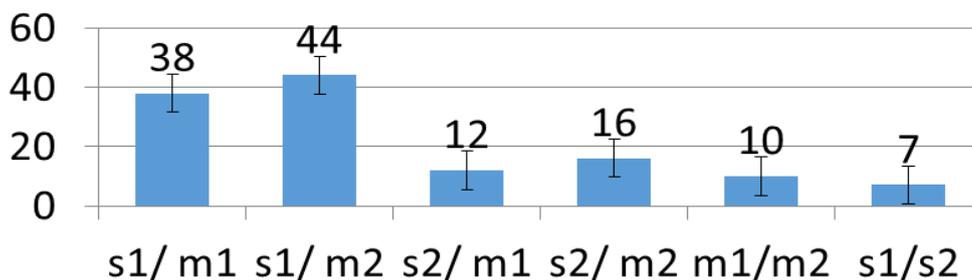
**Рис. 1. Фрагмент ПЦР амплификации генов CagA, VacA s, m-регионов IceA1 и IceA2 *H.pylori*. М-маркер. CagA- 349 п.н. + наличие гена CagA. – ген CagA отсутствует. VacA s1-259 п.н., VacA s2- 286 п.н., VacA m1-570 п.н., VacA m2- 645 п.н., IceA1-247 п.н., IceA2-334 п.н. (bp – base pair (п.н.) пар нуклеотидов).**

В результате генотипирования вирулентных генов *H.pylori* из всех 134 больных было выявлено 106 CagA+ (79%), 110 VacA (82%), 111 IceA (82,8 %). Частота встречаемости аллеля IceA1 гена IceA наблюдается в 2,7 раз больше, чем аллель IceA2, была выявлена коинфекция у 20 пациентов (18%) с аллелями IceA1/IceA2. У 110 из 134 пациентов выявлен ген VacA *H.pylori*, s1 тип гена VacA встречается в 2,7 раза чаще чем s2 тип, а m2 тип гена VacA встречался в 1,1 раз чаще, чем m1 тип гена. Генотипы VacA s1/m2 (44) и s1/m1 (38) встречались чаще, чем генотипы s2/m1 (12), s2/m2 (16).

У 17 (15,4%) больных определена коинфекция по генотипам VacA, т.е., у 7 больных определен генотип s1/s2, у 10 - m1/m2 (рис. 2). Комбинации CagA<sup>+</sup>VacA s1/m2 (43) и CagA<sup>+</sup>VacA s1/m1 (26) встречались чаще, чем другие комбинации *H.pylori*.

У больных, проживающих на территории г. Ташкента выявлены следующие генотипы: из 112 больных у 84 (75 %) определен ген CagA *H.pylori*, у 90 (80,3 %) ген VacA и у 89 (79,5 %) ген IceA. s1 тип гена VacA встречался в 2,0 раза чаще, чем s2 тип, m2 тип встречался в 1,6 раз чаще, чем

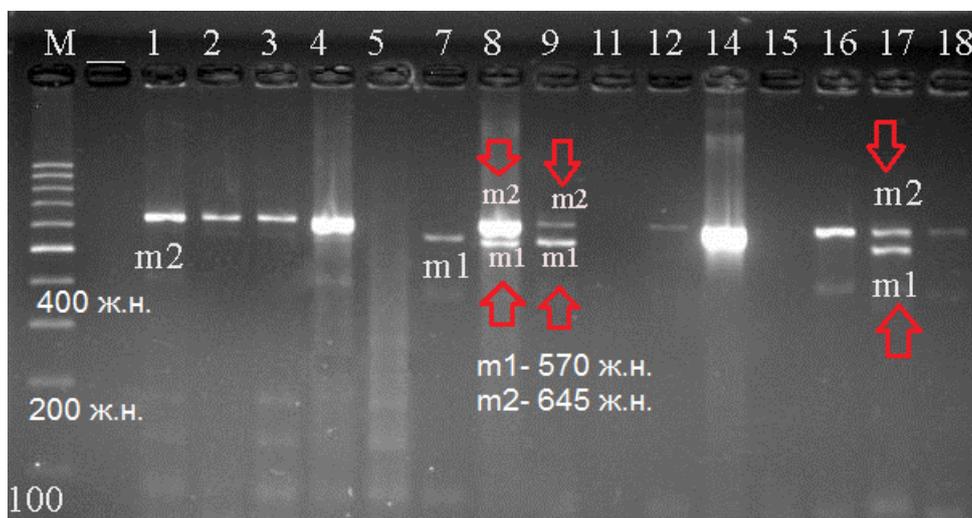
m1 тип. По s/m типу гена *VacA* у 13 больных выявлена коинфекция изолятов бактерий. Аллель *IceA1* встречался в 2,74 раза чаще, чем аллель *IceA2*. У 18 больных (16,4%) выявлена коинфекция изолятов бактерии с аллелями *IceA1/IceA2*.



**Рис. 2. Комбинации аллелей s и m гена *VacA* (Результаты даны в цифрах).**

У всех 22 больных из Наманганской области обнаружены вирулентные гены *CagA*, *IceA* *H.pylori*. *IceA1* аллель гена *IceA* встречался в 6,3 раз чаще, чем аллель *IceA2*, также в 2-х образцах (9,1%) обнаружена коинфекция с *IceA1/IceA2* аллелями. Ген *VacA* обнаружен в 20 изолятах, взятых у пациентов (91%). s1 тип гена *VacA* встречался в 9 раз чаще, чем s2 тип, m2 тип гена *VacA* обнаружился в 1,5 раза чаще, чем m1 тип гена *VacA*.

Если в 6 образцах была обнаружена комбинация гена *VacA* типов s1/ m1, в 10 образцах - s1/m2, в одном образце комбинация типов - s2/m1, то комбинация типов s2/m2 не была обнаружена ни в одном образце. У 3-х больных (на рисунке образцы № 8, 9, 17) (13,6%) встречается коинфекция (рис.3).



**Рис. 3. m- регион гена *VacA* бактерии *H.pylori* из эпителиальной ткани желудка гастроэнтерологических больных, проживающих на территории Намангана. *VacA* m1-570 п.н., m2- 645 п.н.**

Кроме этого, у образцов больных № 4, 8, 14 можно увидеть многочисленные инфекционные колонии *H.pylori* (рис.3). У 16 (14,5%) из 110 обследованных больных, у которых был выявлен ген *VacA* *H.pylori*, была обнаружена коинфекция по s/m типам гена *VacA*. Именно коинфекция может

быть определена на территориях с высокой степенью инфицирования. Данным больным был поставлен диагноз гастрита и язвы двенадцатиперстной кишки.

Всего были взяты 134 образца желудочного сока и биоптатов из слизистой эпителиальной ткани с помощью эндоскопического зонда, а также хирургические биологические образцы. Прогенотипированы по вирулентным генам *H.pylori* 4 группы больных. 37 больным поставлен диагноз рак желудка (РЖ), 42 – гастрит, 31 – язва желудка и двенадцатиперстной кишки (ЯЖДПК), 24 – язвенный колит (ЯК).

Статистически доказано, что у 134 гастроэнтерологических больных из общей группы (ОГ), в сравнении с условно-здоровыми людьми ген *CagA* в 3,76 раза ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0003$ ;  $OR=3,76$ ;  $95\%CI: 2,0-7,0$ ), ген *VacA* в 3,14 раза ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ;  $OR=3,14$ ;  $95\%CI: 1,6-5,9$ ), ген *IceA* в 3,5 раза ( $\chi^2=14$ ;  $p=0,0001$ ;  $OR=3,5$ ;  $95\%CI: 1,8-6,7$ ) больше является фактором высокого риска развития заболевания и что эффективность диагностирования этих генов имеют по классификатору (AUC-классификатор) *CagA* 65% (средний), *VacA* 71% (хороший), *IceA* 70,5% (хороший) значения. Также, было выявлено, что аллель *IceA1* в 3,3 ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0003$ ;  $OR=3,3$ ;  $95\%CI: 1,8-6,0$ ), тип *s1 VacA* в 3,0 ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ;  $OR=3,0$ ;  $95\%CI: 1,7-5,5$ ), тип *m1 VacA* в 2,7 ( $\chi^2=9,2$ ;  $p=0,001$ ;  $OR= 2,7$ ;  $95\%CI 1,4-5,2$ ), а тип *m2* в 2,2 раза ( $\chi^2=7,1$ ;  $p=0,004$ ;  $OR=2,2$ ;  $95\%CI 1,2-4,1$ ) повышают риск возникновения болезни (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Встречаемость генов *CagA*, *IceA* бактерии *H. pylori*, у условно здоровых и больных гастроэнтерологическими заболеваниями.**

Заболевания	<i>CagA</i> <sup>+</sup> , n (%)	<i>IceA</i> , n (%)	<i>IceA1</i> <sup>+</sup> , n (%)	<i>IceA2</i> <sup>+</sup> ,n(%)	<i>IceA1</i> <sup>+</sup> / <i>IceA2</i> <sup>+</sup> , n (%)
РЖ, n=37	31 (83,8 %)*	21 (56,7 %)	19 (90,4 %)*	2 (6,5 %)	-
Гастрит, n=42	30 (71,4 %)*	38 (90,5 %)*	25 (65,7 %)*	13 (34,2 %)	10 (26,3 %)
ЯЖДПК, n=31	27 (87 %)*	28 (90,3 %)*	22 (78,6 %)*	6 (21,4 %)	4 (14,3 %)
ЯК, n=24	18 (75 %)*	24 (100 %)	15 (62,5 %)*	9 (37,5)	6 (25 %)
ОГ: n=134	106 (79 %)*	111 (82,8 %)*	81 (73 %)*	30 (27 %)	20 (18 %)
Условно здоровый, n=76	38,(50%)	44, (57,9%)	24, (54,5%)	20, (45,5%)	0

Примечание: \* -  $p<0,05$ . РЖ- Рак желудка, ЯЖДПК- язва желудка и двенадцатиперстной кишки, ЯК- Язвенный колит, ОГ- Общая группа. n=число.

Было выявлено, что у ОГ, в сравнении с контрольной группой, генотип *s1/m1 VacA* в 2,9 раз ( $\chi^2=7,6$ ;  $p=0,002$ ;  $OR=2,9$ ;  $95\%CI 1,4-6,8$ ), *VacA s1/m2* генотип в 5,6 раз ( $\chi^2=16,1$ ;  $p<0,0001$ ;  $OR=5,6$ ;  $95\%CI 2,4-15,1$ ) больше является фактором риска развития заболевания, подтверждено, что в ОГ в сравнении с контрольной группой генотип *CagA+VacAs1/m1* в 2,8 раз ( $\chi^2=7,0$ ;  $p=0,004$ ;  $OR=2,8$ ;  $95\%CI 1,3-6,5$ ) и генотип *CagA+VacAs1/m2* в 2,87 раз ( $\chi^2=8,4$ ;  $p=0,002$ ;  $OR=2,87$ ;  $95\%CI 1,4-6,2$ ) повышает риск развития заболевания. Статистически доказано, что эффективность диагностирования

по типу m2 гена VacA и A1 аллелю гена Ice составляет 76,7 и 70,5 %, соответственно (хороший классификатор).

Из 37 больных раком желудка (РЖ) у 31 (84 %) обнаружен CagA+, у 24 (64,8 %) VacA, у 21 (56,7 %) IceA, по сравнению с контрольной группой CagA в 5,1 раз ( $\chi^2=12$ ;  $p=0,003$ ; OR=5,1; 95%CI 1,97-11), VacA в 1,3 раза повышает риск возникновения болезни. Аллель IceA1 встречается в 9,5 раз чаще, чем аллель IceA2, по сравнению с контрольной группой повышает риск развития болезни в 2,3 раз ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,3; 95% CI 1,0-5,1). При РЖ тип s1 VacA выявлен в 7 раз больше, чем тип s2, тип m1 тип на 2,6 раз больше чем m2, при этом s1 на 2,2 раз ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,2; 95% CI 1,0-5,0), m1 на 2,8 раз ( $\chi^2=6,0$ ;  $p=0,007$ ; OR=2,8; 95%CI 1,2-6,7) повышает риск возникновения РЖ (табл. 1, 2).

Таблица 2

**Распространенность s и m типов гена VacA у условно здоровых и больных гастроэнтерологическими заболеваниями.**

Заболевания	VacA+	VacAs1	VacAs2	VacAm1	VacAm2
РЖ, n=37	24 (64,8 %)	21 (87,5%)*	3 (12,5 %)	16 (66,7%)*	6 (25 %)
Гастрит, n=42	40 (95,2 %)*	28 (70%)*	12 (30%)	17 (45,9 %)*	20 (54%)*
ЯЖДПК, n=31	29 (93,5%)*	21 (72,4%)*	8 (27,5%)	13 (38%)*	21 (62%)*
ЯК, n=24	24 (100%)	16 (66,7%)*	9 (37,5 %)	10 (37%)*	17 (63%)*
ОГ: n=134	110 (82%)*	85 (72,6%)*	32 (27,3%)	56 (47%)*	64 (53%)*
Условно здоровый, n=76	45, (59%)	28, (62%)	17, (38%)	16, (35,6 %)	22, (48,9 %)

Примечание: \* -  $p<0,05$ . РЖ- Рак желудка, ЯЖДПК- язва желудка и двенадцатиперстной кишки, ЯК- Язвенный колит, ОГ- Общая группа. n=число.

Статистически доказано, что при РЖ, по сравнению с контрольной группой, генотип s1/m1 VacA в 3,9 раз ( $\chi^2=8,6$ ;  $p=0,001$ ; OR=3,9; 95%CI 1,5-11,0) повышает риск развития болезни, также соответственно комбинация CagA+VacAs1/m1 повышает риск развития РЖ в 3,5 раз ( $\chi^2=6,9$ ;  $p=0,004$ ; OR=3,5; 95%CI 1,3-9,7). Между РЖ и другими генотипами и комбинациями ассоциации не выявлены.

У 30 (71,4%) из 42 больных с гастритом выявлен ген CagA+, у 40 (95,2 %) VacA, у 38 (90,5%) IceA, риск развития болезни по сравнению с контрольной группой повышается при CagA в 2,5 раза ( $\chi^2=5,1$ ;  $p=0,012$ ; OR=2,5; 95% CI 1,1-5,7), аллели IceA1 в 3,15 ( $\chi^2=8,7$ ;  $p=0,001$ ; OR=3,15; 95% CI 1,4-7,0), VacAs1 в 3,4 ( $\chi^2=9,65$ ;  $p=0,0009$ ; OR=3,4; 95%CI 1,5-7,6), VacAm1 в 2,5 ( $\chi^2=5,0$ ;  $p=0,01$ ; OR=2,5; 95%CI 1,1-5,8), VacAm2 в 2,2 раза ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ; OR=2,2; 95%CI 1,0-4,9). У 10 (26,3 %) больных наблюдалась коинфекция IceA1/IceA2. s1 тип VacA в 1,75 раз встречается чаще чем тип s2 (табл. 1, 2). По сравнению с контрольной группой изоляты с генотипом VacA s1/m1 повышают риск возникновения болезни в 5,5 раз ( $\chi^2=14$ ;  $p<0,0001$ ; OR=5,5; 95%CI 2,9-14,0), изоляты с генотипом VacA s1/m2 в 5,7 раз ( $\chi^2=12,4$ ;  $p=0,0002$ ; OR=5,7; 95%CI 2,0-14,0). Также, статистически доказано, что риск возникновения гастрита при VacAs1/m1 CagA++ повышается в 3,3 раза

( $\chi^2=6,5$ ;  $p=0,005$ ;  $OR=3,3$ ;  $95\%CI$  1,3-8,9), при  $VacAs1/m2$   $CagA^{++}$  в 2,9 раз ( $\chi^2=5,7$ ;  $p=0,008$ ;  $OR=2,9$ ;  $95\%CI$  1,2-7,4) по сравнению с контрольной группой.

У 27 из 31 больных язвой желудка и двенадцатиперстной кишки (ЯЖДПК) выявлен ген  $CagA^+$ , у 29  $VacA$ , у 28  $IceA$ , по сравнению с контрольной группой выявлено, что  $CagA$  6,6 раз ( $\chi^2=12,7$ ;  $p=0,0002$ ;  $OR=6,6$ ;  $95\%CI$  2,2-12),  $VacA$  9,8 ( $\chi^2=12,2$ ;  $p=0,0002$ ;  $OR=9,8$ ;  $95\%CI$  2,5-21,0) больше являются фактором риска возникновения болезни, также, при ЯЖДПК аллель  $IceA1$  по сравнению с контрольной группой 5,2 ( $\chi^2=14$ ;  $p=0,0009$ ;  $OR=5,2$ ;  $95\%CI$  2,1-13),  $VacAs1$  2,2 ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,02$ ;  $OR=2,2$ ;  $CI$  1,0-5,0),  $m1$  2,7 ( $\chi^2=4,8$ ;  $p=0,01$ ;  $OR=2,7$ ;  $95\%CI$  1,1-6,7) и  $m2$  5,0 раз ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ;  $OR=5,0$ ;  $95\%CI$  2,1-12) являются фактором риска возникновения болезни. У больных тип  $m2$  выявлен в 1,6 раз больше, чем тип  $m1$ . У 4 (14,3 %) больных выявлена коинфекция аллелей  $IceA1/IceA2$  (табл. 1, 2). Статистически доказано, что при ЯЖДПК по сравнению с контрольной группой изоляты с генотипом  $VacA$   $s1/m2$  в 12,0 раз ( $\chi^2=21$ ;  $p<0,0001$ ;  $OR=12,0$ ;  $95\%CI$  4,1-19,0), изоляты с генотипом  $CagA/VacAs1/m2$  в 6,2 раз ( $\chi^2=14$ ;  $p<0,0001$ ;  $OR=6,2$ ;  $95\%CI$  2,4-15,0) больше повышают риск возникновения болезни.

У 24 больных диагностирован язвенный колит (ЯК), из них у 18 (75 %) выявлен  $CagA^+$ , у 24 (100%)  $VacA$ , статистически доказано, что при ЯК по сравнению с контрольной группой,  $CagA$  в 2,9 раза ( $\chi^2=4,6$ ;  $p=0,01$ ;  $OR=2,9$ ;  $CI$  1,0-8,9);  $s1$  в 3,4 раза ( $\chi^2=6,5$ ;  $p=0,005$ ;  $OR=3,4$ ;  $95\%CI$  1,3-9,4),  $m1$  в 2,6 раз ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,02$ ;  $OR=2,6$ ;  $95\%CI$  1,0-7,1) и  $m2$  в 5,8 раз ( $\chi^2=13$ ;  $p=0,0001$ ;  $OR=5,8$ ;  $95\%CI$  2,2-13) больше приводит к высокому риску возникновения заболевания. При ЯК тип  $s1$   $VacA$  по сравнению с типом  $s2$  встречается в 1,77 раз чаще, тип  $m2$  по сравнению с типом  $m1$  в 1,7 раз чаще. У всех больных ЯК выявлен ген  $IceA$ , аллель  $IceA1$  встречается в 1,67 раз чаще, чем аллель  $IceA2$ . У 6 (25%) больных обнаружена комбинация  $IceA1/IceA2$ . Доказано, что при ЯК аллель  $IceA1$ , по сравнению с контрольной группой, в 3,5 раза ( $\chi^2=7,3$ ;  $p=0,003$ ;  $OR=3,5$ ;  $95\%CI$  1,37-9,6) увеличивает риск возникновения заболевания (табл. 1, 2). Статистически доказано, что при ЯК, по сравнению с контрольной группой,  $VacA$   $s1/m1$  в 3,0 раза ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ;  $OR=3,0$ ;  $95\%CI$  1,0-9,5),  $VacAs1/m2$  5,7 раз ( $\chi^2=9,8$ ;  $p=0,0009$ ;  $OR=5,7$ ;  $95\%CI$  1,7-20,0) повышает риск возникновения болезни. Также, при ЯК, по сравнению с контрольной группой, генотип  $CagA/VacAs1/m1$  в 3,0 раза ( $\chi^2=4,1$ ;  $p=0,02$ ;  $OR=3,0$ ;  $95\%CI$  1,0-9,5) и генотип  $CagA/VacAs1/m2$  в 2,9 раз ( $\chi^2=4,2$ ;  $p=0,02$ ;  $OR=2,9$ ;  $95\%CI$  1,0-8,6) больше являются фактором риска возникновения болезни.

По эффективности диагностирования (AUC-классификатор) ген  $CagA$  показал среднее значение по всем заболеваниям (61-68 %), гены  $VacA$  и  $IceA$  показали хорошее значение по ОГ, Гастриту, ЯБЖДК, ЯК (71-79,6%),  $m2$  тип  $VacA$  хорошее значение 76,7 % по общей группе. Это означает, что гены  $CagA$ ,  $VacA$  и  $IceA$  могут использоваться в качестве маркерных генов при диагностировании заболеваний. Но, в некоторых образцах  $s$  или  $m$  регионы  $VacA$  не обнаружены, из-за чего у них обнаружена низкая степень риска. Это

в свою очередь означает наличие изменений на сайте связывания праймеров маркерных генов у местных изолятов, а также показывает значимость изучения нуклеотидной последовательности маркерных генов местных изолятов для их определения.

Выявлено, что у гастроэнтерологических больных комбинации s1/m1 (38) и s1/m2 (44) s/m региона встречается чаще, чем комбинации s2/m1 (12) и s2/m2 (16). У больных РЖ, Гастритом, ЯК, ОГ выявлена ассоциация с комбинациями s1/m1 VacA, у больных Гастритом, ЯЖДПК, ОГ выявлена ассоциация с комбинациями s1/m2 VacA ( $p < 0,05$ ) (таблица 3).

Таблица 3

**Встречаемость комбинаций s и m типов гена VacA *H.pylori* при гастроэнтерологических заболеваниях**

Заболевания	VacA+, n	VacA+, n							
		s1/ m1	s1/ m2	s2/ m1	s2/ m2	s1/ m0	s2/ m0	s0/ m1	s0/ m2
РЖ, n=37	24	13*	6	3	-	2	-	-	-
Гастрит, n=42	40	13*	14*	3	5	1	4	1	1
ЯЖДПК, n=31	29	5	16*	5	3	-	-	3	2
ЯК, n=24	24	7*	8*	1	5	5	-	-	2
ОГ: n=134	110	38*	44*	12	13	8	3	4	6
Условно здоровый, n=76	45	9	7	6	10	13	-	-	6

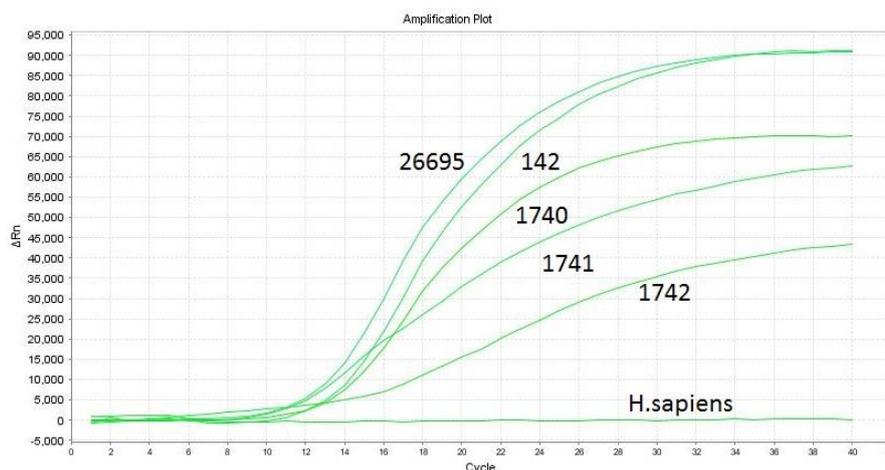
Примечание: \* -  $p < 0,05$ . РЖ- Рак желудка, ЯЖДПК- язва желудка и двенадцатиперстной кишки, ЯК- Язвенный колит, ОГ- Общая группа. n=число.

При статистическом изучении комбинации между s/m типом генов CagA и VacA и заболеваниями, обнаружена ассоциация генотипа CagA/VacA s1/m1 с РЖ, Гастритом, ЯК, ОГ больных, генотипа CagA/VacA s1/m2 с гастритом, ЯЖДПК, ЯК, ОГ больных ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, при гастроэнтерологических заболеваниях гены CagA, VacA s1, m1, m2/ IceA1 бактерии *H.pylori* могут быть определены в качестве вирулентных генов, в случаях обнаружения этих генов в изолятах рекомендуется антибактериальная терапия.

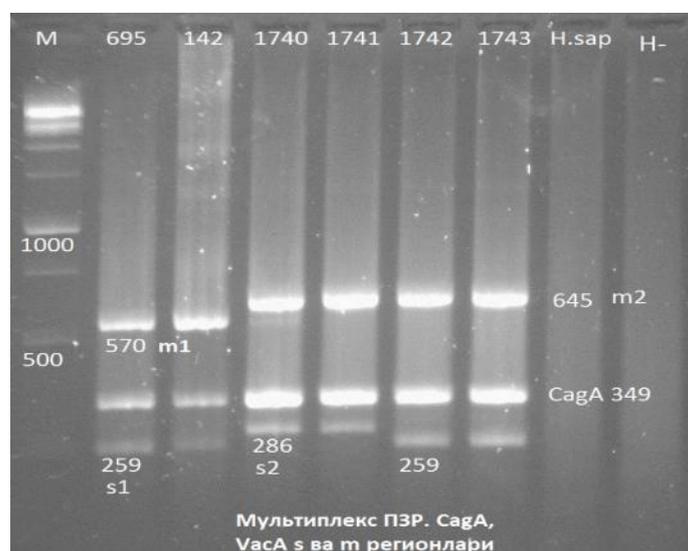
Из-за наличия во многих клиниках Real-Time PCR амплификаторов был разработан метод ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR) определения гена CagA *H.pylori*. Было выявлено наличие гена CagA в культуральных образцах бактерии во всех местных культуральных образцах *H.pylori* (рис. 4).

Достигнута экономическая эффективность за счет экономии расхода реактивов в 3 раза. Согласно результатам мультиплексной ПЦР типы s1, m1 гена VacA определены в местных изолятах 132, 142, в местных изолятах 1740, 1741 – типы s2/m2, в 1742, 1743 – типы s1/m2. Если 132, 142 и 1749 изоляты были взяты у больных раком желудка, то изоляты 1742, 1743 – у больных с язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, изоляты 1740, 1741 – у больных с гастритом.



**Рис. 4. График амплификации методом ПЦР в режиме реального времени гена CagA *H.pylori***

В диссертационном исследовании для идентификации генов с регионами CagA VacA s, VacA был оптимизирован метод мультиплексной ПЦР (рис. 5).

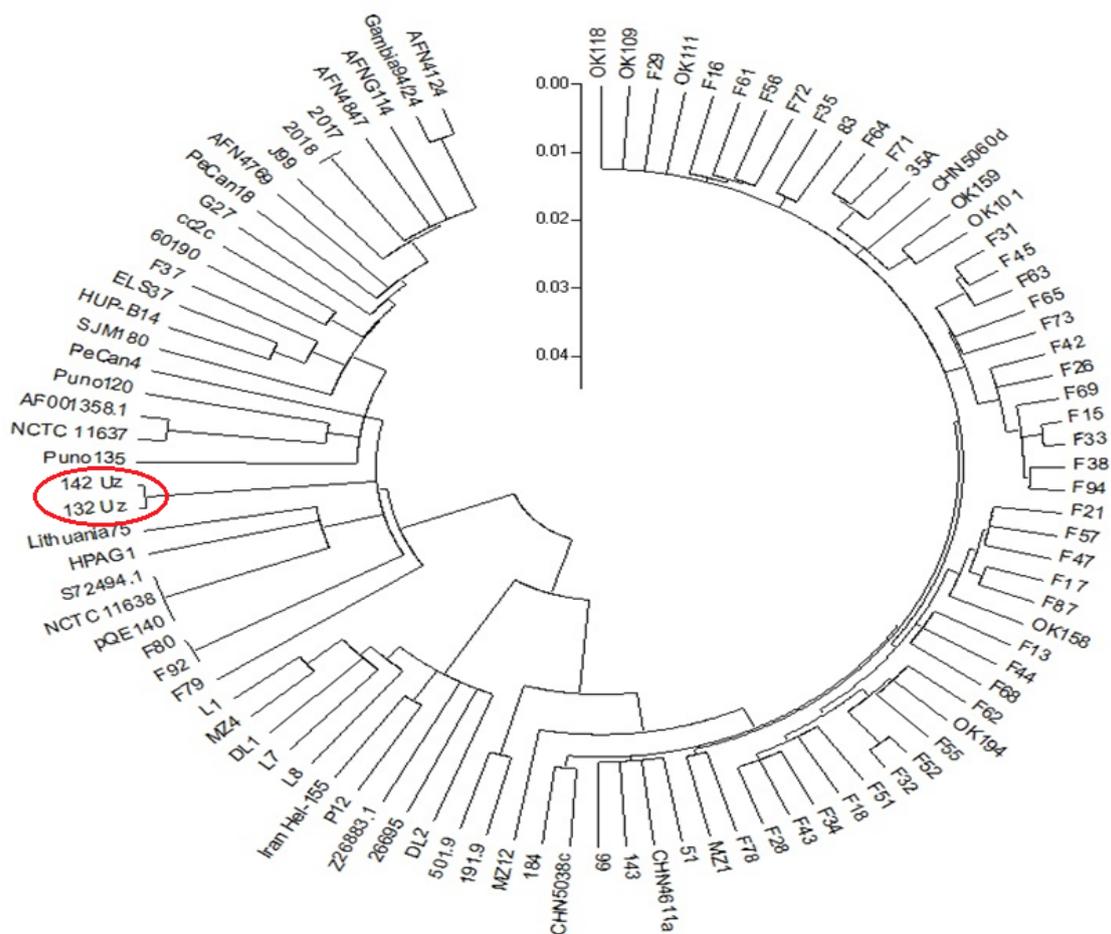


**Рис.5. Продукт амплификации мультиплексной ПЦР s, m- регионов генов CagA, VacA *H.pylori*. на 2 % агарозном геле. 695 -26695, 142, 1740, 1741, 1742, 1743 продукт амплификации ПЦР, ДНК венозной крови *H.sapiens* и H- отрицательный контроль (вода). CagA – 349 п.н., VacA s1-259 п.н., s2-286 п.н., VacA m1-570 п.н., VacA m2-645 п.н. (пар нуклеотидов).**

В четвертой главе диссертации «Нуклеотидная последовательность гена VacA местных изолятов *H.pylori* и её сравнительный анализ» приведены результаты секвенирования гена VacA местных изолятов *H.pylori*, также определения локализации m-региона гена VacA местных изолятов в отличии от мировых штаммов, и приближенности по s-региону гена VacA к другим мировым штаммам. Эти данные подтверждают разнообразие штаммов нашей территории, которые относятся к различным географическим климатическим поясам, также высокую степень инфицирования и показателя рекомбинации штаммов бактерии.

Для проведения секвенирования гена VacA *H.pylori* проведен дизайн 5-видов праймеров (VTF, 506F, 992F, 1512F и VTR), также секвенированы





**Рис. 7. Филогенетический анализ гена VacA местных изолятов *H.pylori*. Местные 132-Uz и 142-Uz изоляты *H.pylori* находятся в отдельных кластерах от мировых штаммов.**

Нуклеотидная последовательность гена VacA местных изолятов 132, 142 и 1749 теоретически переведена в последовательность белка (состоит из 810 аминокислот) VacA с помощью онлайн программы и сопоставлена с белком VacA других мировых штаммов *H.pylori* (NCBI Protein BLAST). Результаты анализа показали, что большинство мутаций расположены в субъединице р33. Белок VacA местных изолятов 132 и 142 имеет 35 аминокислотных мутаций, из них 24 обнаружены только в местных изолятах 132, 142 и отличаются от других штаммов или изолятов. 11 мутаций обнаружены также в меньшем количестве изолятов. В результате филогенетического и сравнительного анализов белка VacA, у 132 и 142 местных изолятов сходство составило 99%, а 1749 отличался от изолятов 132 и 142.

Теоретически, с помощью программ PyloPhen-2 и prediction protein, изучено влияние изменений в последовательности аминокислот на клетку и активность белка. Выявлено, что основные мутации (n=29) расположены в субъединице р33 белка VacA. В ионном канале субъединицы р33 между 1 и 32 аминокислотой вместо 19-аминокислоты треонина в изолятах 132 и 142 расположена аминокислота аланин. В сайте олигомеризации (между 49-57 аминокислотами) вместо 55-аминокислоты лизина в изолятах 132 и 142 расположена аминокислота аргенин. В сайте взаимосвязи субъединиц р33 и

p55 белка VacA на участке 328 аспарагин заменен аспарагиновой кислотой, на участке 340 трионин или аланин заменен глицином. На 623 участке сайта, отвечающего за секрецию и фолдинг белка глутамин заменен на тирозин. Также выявлена инсерция трех аминокислот (Серин, Аспарагин, Гистидин), расположенных после 216-аминокислоты субъединицы p33. А в субъединице p55 гена VacA обнаружено несколько мутаций, которые располагаются на начальном участке (посередине 312-460 аминокислот). По литературным данным, именно на этом участке эпителиальная клетка связывается с рецептором плазматической мембраны.

Возможно, эти мутации оказывают влияние на экспрессию и токсическую активность белка, а также на способность токсина связываться с различными рецепторами клеток, в том числе образованию канала в плазматической мембране и усилению способности проникать в митохондрии.

Проведен сравнительный анализ i-региона белка VacA местных изолятов 132, 142 и 1749 *H.pylori* с данным регионом мировых штаммов. Если в гене VacA местного изолята 1749 был определен i1-регион, в местных изолятах 132 и 142 выявлен i3-регион (табл. 4).

**Таблица 4.**

**Полиморфизмы аминокислот i-региона белка VacA**

i-регион	A кластер	B кластер	C кластер	Летература
i1	YKDSADRTTRVDFN	QASEGITSSK	ASNS---VKLN GN	206; 926–936
	YKDSADRTTRVDFN	QASE.ITS	AS.---SV	59; 690–696
	FKDSADRTTRVDFN	QASEGITS.K	ASNS---VKLMGN	120; 101–110
i1_1749_Uz	YKDSADRTTRVDFN	QASEGITSSK	ASSS---VKLMGN	Местный изолят
i2	FKDGANRTTRVDFN	KSSEKITSRE	VSSSNQSV AIY GK	206; 926–936
	FKDGANRTTRVDFN	KSSEKITSRE	VSSSN.SV AIY EK	59; 690–696
	FKDGANRTTRVDFN	QASEKITSRE	VSSSNH SV AIY GK	120; 101–110
i3_i1	FKDSADRTTRVDFN	QASEGITS.K	ASNS---VKLMGN	120; 101–110
i3_i2	FKDGANRTTRVDFN	QASEKITSRE	VSSSNH SV AIY GK	
i3_142_Uz	FKDGANRTTRVDFN	QASEKITSRE	VQSSNHSTKLYGK	Местный изолят
I3_132_Uz	FKDGANRTTRVDFN	QASEKITSRG	VQSSNHSTKLYGK	

При анализе i-региона VacA, в кластере-B i3-региона гена VacA изолята 132 присутствует E-Глутаминовая кислота, которая встречается у других штаммов или произошла замена аминокислоты K-лизин на аминокислоту G-Глицин. В кластере-C i-региона изолятов 132 и 142 S-серин замещен аминокислотой Q-Глутамин. В C-кластере i-региона изолята 1749 N-аспарагин замещен аминокислотой S-серин. Данные мутации могут быть специфичными для местных изолятов *H.pylori* и могут повышать вирулентную способность белка VacA. Известна более высокая токсичность типа i1 гена VacA в сравнении с типом i2, но приведены данные о том, что изоляты с типом i3 встречаются редко и что этот тип произошел в следствии химеры типов i1, i2, степень вирулентности у них изучена недостаточно. Если штаммы с типом i1 подвергали вакуолизации разные клетки, то

штаммы с типом i2 приводили к вакуолизации только клетки определенного типа.

Для определения вирулентности *H.pylori* в систему генотипирования теста ПЦР вместе с определением регионов s, m гена VacA целесообразно будет внести также определение региона i гена VacA *H.pylori*.

## ВЫВОДЫ

1. Проведено генотипирование по вирулентным генам изолятов *H.pylori*, распространенных на территории Ташкентской и Наманганской областей. Обнаружена высокая встречаемость вирулентных генетических вариантов, так CagA ген определен в 79,1% случаях, s1 вариант гена VacA наблюдался в 2,65 раза чаще чем s2 вариант, при этом не было различий между встречаемостью типов m1 и m2 (56/64), аллель IceA1 обнаруживалась в 2,7 раз чаще, чем аллель IceA2.

2. Определена ассоциация аллеля IceA1 со всеми исследованными заболеваниями желудочно-кишечного тракта (OR: 3,3; 95%CI 1,8-6,0; p=0,0001). CagA/VacA s1/m1 генотип ассоциируется с раком желудка (OR:3,5; 95%CI 1.3-9.7; p=0,004), CagA/VacA s1/m2 генотип ассоциируется с язвой желудка и двенадцатиперстной кишки (OR:6,2 95%CI 2.4-15,0; p<0,001). Вирулентные гены *H.pylori* CagA (AUC=65%), VacA (AUC=71%), IceA (AUC=70,5%) могут быть включены в панель диагностирования заболеваний желудочно-кишечного тракта.

3. Разработан метод Real-Time PCR для определения наличия гена CagA, а также метод мультиплексной ПЦР для типирования генов CagA и VacA, при этом ожидаемая экономическая эффективность метода повышается в 3 раза.

4. Впервые в Центральной Азии проведено секвенирование гена VacA местных изолятов *H.pylori*. Филогенетический анализ показал разнообразие изолятов Узбекистана и их отдельное расположение от других мировых штаммов.

5. Изменения гена VacA в местных изолятах бактерии *H.pylori* могут влиять на уровень экспрессии белка, взаимодействия токсина с различными типами рецепторов на плазматической мембране эпителиальных клеток желудка, а также на формирование пор и усиление проникновения в митохондрии.

**ONCE-ONLY SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC  
DEGREES DSc.29.12.2018.B.01.13 AT THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS  
AND BIOCHEMISTRY, NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

---

**INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY**

**ABDURAXIMOV ABRORJON AKROMOVOVICH**

**INVESTIGATING GENETIC FACTORS OF *HELICOBACTER PYLORI*  
VIRULENCE**

**03.00.01 – Biochemistry, 03.00.03 - Molecular biology. Molecular genetics.  
Molecular biotechnology**

**DISSERTATION ABSTRACT  
of the doctor of philosophy (PhD) of biological sciences**

**Tashkent – 2019**

**This dissertation of PhD has been registered with the number B2018.4.PhD/B144 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan**

The dissertation has been prepared at the Institute of Biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council and on the website of “ZiyoNet” information and educational portal.

<b>Scientific supervisor:</b>	<b>Turdikulova Shakhlokhon Utkurovna</b> doctor of biological sciences
<b>Official opponents:</b>	<b>Abdullaev Alisher Abdumavlyanovich</b> doctor of biological sciences <b>Dalimova Suraya Nugmanovna</b> doctor of biological sciences, professor
<b>Leading organisation:</b>	<b>Center of Genomics and bioinformatics</b>

The defence of the dissertation will take place on «\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 year \_\_\_\_ at the meeting of the Scientific council DSC.29.12.2018.B.01.13 on award of scientific degrees at the Institute of Biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan. Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student’s town, University St. 174. (4<sup>th</sup> floor of the building of the Faculty of Chemistry, National University of Uzbekistan). Phone: (+99871) 246-68-96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of Biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan (registration number D- ). Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student’s town, University St. 174. Phone: (+99871) 246-68-96, e-mail: [ibb-nuu@mail.ru](mailto:ibb-nuu@mail.ru).

Abstract of dissertation is distributed on «\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 year  
(Protocol at the register \_\_\_\_\_ on «\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 year).

**Sabirov Ravshan Zairovich**

Chairman of once-only scientific council  
awarding scientific degrees, D.B.Sc., academician

**Asrarov Muzaffar Islamovich**

Scientific secretary of once-only scientific council  
awarding scientific degrees, D.B.Sc., professor

**Sherimbetov Sanjar Gulmirzoevich**

Chairman of once-only Scientific seminar under once-  
only scientific council awarding scientific degrees, D.B.Sc.

## INTRODUCTION (PhD thesis abstract)

**The aim of the research work** was identifying association between genetic factors of *H.pylori* and gastrointestinal diseases. Study of the nucleotide sequence of the VacA gene of local *H. pylori* isolates.

**The object of the research work:** DNA samples of *H.pylori* from clinical isolates. HP-26695 strain of *H.pylori* from the collection of ATCC (collection of American strains and tissues) was used as a control strain.

**Scientific novelty of the research work** is as follows: Degree of incidence of virulent CagA, IceA and VacA genes of *H.pylori* and their association with gastrointestinal diseases was identified;

Multiplex PCR method for genotyping virulent CagA, VacA genes was developed;

Real-time PCR method for identifying CagA gene in *H.pylori* was developed;

New nucleotide mutation, specific to our region was identified in VacA gene in *H.pylori* from the territory of Uzbekistan, it is proven, that this mutation is specific for local isolates and helps to differentiate them from other strains.

### **Implementation of the research results:**

On the basis of obtained results of sequencing VacA gene, genotyping virulence markers of CagA, VacA, IceA genes of local *H.pylori* bacteria isolate:

the method of polymerase chain reaction (PCR) was used to identify local cultures of *H.pylori* within fundamental project  $\Phi A-\Phi 6-T219$  "Studying the influence of bacteriocin like compounds, produced by local strains of *Lactobacillus casei* group to *Helicobacter pylori*, aetiological agent of stomach and duodenal diseases" (certificate of Academy of sciences Republic of Uzbekistan № 4/1255-586 from 4th of march 2019). As a result, it made it possible to achieve high specificity of the determination of bacterial cultures, as well as to determine non-pathogenic and pathogenic strains.;

improved multiplex PCR method was used in  $\Phi A-\Phi 6-T219$  project "Studying the influence of bacteriocin like compounds, produced by local strains of *Lactobacillus casei* group to *Helicobacter pylori*, aetiological agent of stomach and duodenal diseases" (certificate of Academy of sciences Republic of Uzbekistan № 4/1255-586 from 4th of march 2019). As a result, when determining cultures of bacteria, it gave the opportunity to achieve savings of reagents 3 times and economic efficiency;

the nucleotide (KY779729.1, KY779730.1) and amino acid (AVH78333.1, AVH78334.1) sequences of VacA gene from local isolates of the *H. pylori* bacterium are introduced into the international NCBI and ENA database. (certificate from University of California on January 17, 2019). As a result, it was possible to determine the specificity of the isolates of the bacterium *H.pylori*, which are common in Uzbekistan, as well as comparing the sequence data with the strains that are found in different continents of the world.

**The structure and volume of the thesis.** The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusion, references and appendix. The volume of the thesis is 116 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОБУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**  
**I бўлим (I часть, I part)**

1. Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У., Далимова Д. А., Рустамова Ш. О., Отаева З. М. Наманган вилоятида *Helicobacter pylori* бактерияси *VacA* генини генотиплаш // Инфекция, иммунитет ва фармакология. –2011. – №. 1-2. –128-131 Б. (03.00.00. №7)

2. Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У., Далимова Д. А., Мухаммедов Р.С. Ўзбекистон худудида тарқалган *Helicobacter pylori* бактерияси *VacA* гени м регионининг филогенетик таҳлили//Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг маърузалари. – 2012. –№. 3. –54-57 Б. (03.00.00. №6)

3. Абдурахимов А.А., Далимова Д.А, Турдикулова Ш.У., Мухамедов Р. С. Гастроэнтерологик касалликларда *Helicobacter pylori* бактерияси *VacA* ва *IсеА* генларининг такрорланиш даражаси //Биология ва тиббиёт муоммолари. – 2013. – №. 1 (72). – 11-14 Б. (14.00.00. №19)

4. Sh. Turdikulova, D.Dalimova, A. Abdurakhimov, B.Adilov, M.Djuraev, S. Abdujapparov, M.Tukhtaboeva, A. Abdikhakimov, R. Mukhamedov. Genetic markers of breast and gastric cancers in Uzbekistan population // Узбекский Биологический Журнал. –2017. –№6. –Р. 55-60. (03.00.00. №5)

5. Abdurakhimov Abrorjon Akramovich, Dalimova Dilbar Akbarovna, Turdikulova Shakhlo Utkurovna. Study of mutations in the 23 S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *H.pylori* // European science review. – 2018. –V.1. –№. 9–10. –P.3-5. GIF 1,36.

6. Abdurakhimov Abrorjon Akramovich, Dalimova Dilbar Akbarovna, Turdikulova Shakhlo Utkurovna. Detection of *Helicobacter pylori* and gene *CagA* with use Real-Time PCR in the Uzbekistan// European science review. –2018. – V.2. –№. 11–12. –P.6-9. GIF 1,36.

**II бўлим (II часть, part II)**

1. Dalimova Dilbar Akbarovna, Abdurakhimov Abrorjon Akramovich, Turdikulova Shakhlo Utkurovna. Distribution of *Helicobacter pylori* genotypes in two areas of Uzbekistan with different gastric cancer risk// European science review. –Vienna, Austria. –2019. – V.2. –№. 1–2. –P.3-6. GIF 1,36.

2. Shahlo Turdikulova, Dilbar Dalimova, Abror Abdurakhimov, Bekzod Adilov, Sarymsak Navruzov, Abror Yusupbekov, Mirjalol Djuraev, Suleyman Abdujapparov, Dilshod Egamberdiev, Rustam Mukhamedov. Association of rs2294008 and rs9297976 Polymorphisms in PSCA Gene with Gastric Cancer Susceptibility in Uzbekistan // Central Asian Journal of Global Health. – University of Pittsburgh, USA – 2016. – Vol.5. –№1. (2016 ISSN 2166-7403 (online) DOI 10.5195/cajgh.2016.227. – P. 227-245.

3. Далимова Д. А., Абдурахимов А.А., Юсупов Ш.А., Турдикулова Ш. У. Исследование ассоциации генотипов *VacA* и *CagA* бактерии *Helicobacter pylori* с гастродуоденальными заболеваниями в Узбекистане // Вісник

наукових досліджень. – Тернополь, Україна. – 2015. – №. 2.(79). –С. 9-21.

4. Turdikulova Sh., Ibragimov. K., Abdurakhimov A. Genotyping *Helicobacter pylori* strains from Uzbekistan. HELICOBACTER. – 2008. – Vol.13. – N5. – P.418.

5. Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У. *Helicobacter pylori* VacA генини секвинсга тайёрлаш // “Фаннинг долзарб муаммолари ёш олимлар нигоҳида” республика илмий-амалий конференция. – Тошкент, 29 октябрь, 2010. — 50 Б.

6. Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У., Далимова, Д.А. Ўзбекистон ҳудудида тарқалган *Helicobacter pylori* бактерияси VacA гени s регионининг филогенетик таҳлили // Ўзбекистон микробиологлари V қурултойи. – Тошкент, 12-13 октябрь, 2012. – 6. Б.

7. Далимова Д.А., Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У. Частота встречаемости генов вирулентности *Helicobacter pylori* в Узбекистане // Академический журнал Западной Сибири.– Коста Брава, Испания. 24-26 февраля, 2013.–№1. –Т.9. –С.53-54.

8. Абдурахимов А.А., Далимова Д.А., Турдикулова Ш.У., Мухамедов Р.С. *Helicobacter pylori* 142 штаммининг VacA гени ва у кодловчи оксилнинг вариациялари // Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 70 йиллигига бағишланган республика ёш олимлар конференцияси. – Тошкент, 26 декабр, 2013.–17-18. Б.

9. Abdurakhimov A.A., Dalimova D.A., Turdikulova Sh.U., Mukhamedov R.S. The prevalence of the CagA and VacA genotypes of *H. pylori* from patients with upper gastrointestinal diseases in Uzbekistan // European Human Genetics Conference. – Milan, Italy, May 31 – June 3, 2014. – V. 22. – S.1. – P.394.

10. Абдурахимов А.А., Далимова Д.А., Турдикулова Ш.У., Адиллов Б.Р., Мухамедов Р.С. Тошкент минтақасида *Helicobacter pylori* вирулент генларининг учраши ва гастроэнтерологик касалликлари билан боғлиқлиги // Актуальные вопросы клиникалабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией. Материалы научно-практической конференции с международным участием. – Самарканд, 10 - 11 ноябрь, 2015. №4 (85). – С. 11.

11. Далимова Д.А., Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У., Адиллов Б.Р., Мухамедов Р.С. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена VacA 132 штамма бактерии *Helicobacter pylori*, встречаемой в Узбекистане // “Микроорганизмы и биосфера” Международный Симпозиум. –Tashkent, 25-27 november, 2015. – С. 184-185.

12. Абдурахимов А.А., Далимова Д.А., Джамалова Д.Ф., Турдикулова Ш.У., Мухамедов Р.С. Наманган ҳудудида *Helicobacter pylori* бактериясининг CagA, VacA ва IceA генлари бўйича генотиплаш // профессор Валиханов Мухсин Набихановичнинг 80-йиллик таваллудига бағишланган “Биология, экология ва тупроқшуносликнинг долзарб муаммолари” мавзусидаги илмий-амалий семинар. –Тошкент, 25 ноябрь, 2015. – 52-53. Б.

13. Абдурахимов А.А., Далимов Д.А., Турдикулова Ш.У., Мухамедова Д.Ш., Мухамедов Р.С. Real-Time PCR методи ёрдамида *Helicobacter Pylori*

кларитромицинга чидамлилиқ билан боғлиқ 23 S рРНК генининг мутацияларини аниқлашни оптималлаштириш // Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари. Республика илмий анжуманининг тезислар тўплами. –Тошкент, 18 май 2016. – 5-7. Б.

14. Djamalova D.F., Mukhamadova D.Sh., Abdurakhimov A.A., Turdikulova Sh.U., Dalimova D.A. Some facts about resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin. Профессор Мирходжаев Улуғбек Закировичнинг 70 йиллик таваллудига бағишланган Физик-кимёвий биология ва экотоксикологиянинг замонавий муаммолари мавзусидаги илмий-амалий анжумани материаллари. –Тошкент, 26 апрель, 2016. – 64-65. Б.

15. Джамалова Д.Ф., Мухамедова Д.Ш., Абдурахимов А.А., Далимова Д.А. Турдикулова Ш.У. Обзорные данные о развитии резистентности *Helicobacter pylori* к Кларитромицину // Биоорганическая химия в решении актуальных задач здравоохранения и сельского хозяйства. Республиканская конференция молодых ученых. Институт Биоорганической химии им. Академика А.С.Садыкова. –Ташкент, 15-16 ноября, 2016.– С. 80-81.

16. Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У., Мирхайдарова М.Д., Мухамедова Д.Ш., Мухамедов Р.С., Далимова Д.А. *H.pylori* бактериясини кларитромицинга чидамлилигини таъминловчи 23S рРНК генининг полиморфизмларини ўрганиш // Соғлиқни сақлаш ва қишлоқ хўжалигининг долзарб муаммоларини ечишда биоорганик кимёнинг роли. Ёш олимлар Республика конференцияси. –Тошкент, 15-16 ноябрь, 2016. – 71-72. Б.

17. Абдурахимов А.А., Турдикулова Ш.У., Далимов Д.А., Мирхайдарова М.Д. Мухамедова Д.Ш. *Helicobacter pylori* 23S рРНК генининг 2142 ва 2143 участкаларидаги мутацияларни аниқлаш // Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари республика илмий анжуманининг тезислар тўплами. –Тошкент, 18 май, 2017 й. – 3-4 Б.

18. Абдурахимов А.А., Далимова Д.А., Турдикулова Ш.У. Определение мутаций в гене 23S рРНК *H.Pylori* в Узбекистане // Материалы международной научной конференции «Лекарственные препараты на основе природных соединений», –Ташкент, 18-19 сентября, 2018. –С.164.

19. Abdurakhimov A.A., Turdikulova S.U., Dalimova D.A. Sequence analysis of *H.Pylori* VacA gene in Uzbekistan // Материалы международной научной конференции «Лекарственные препараты на основе природных соединений». –Ташкент, 18-19 сентября, 2018. – С.165.

Автореферат «Ўзбекистон Биология журналы» таҳририятида таҳрирдан ўтказилди.

Муаллиф диссертация ишини бажаришда ФА-Ф4-Т106 лойиҳа раҳбари биология фанлари доктори, профессор Муҳамедов Рустам Султановичга ҳамда биология фанлари номзоди, катта илмий ходим Далимова Дилбар Акбаровнага ўз миннатдорчилигини билдиради.

Босишга рухсат этилди 07.05.2019 йил  
Бичими 60x84 1/16 «Times New Roman»  
гарнитурда рақамли босма усулида чоп этилди.  
Шартлибосма тобоғи 2,75. Адади 70. Буюртма №  
«IMPRESS MEDIA» босмахонасида чоп этилди.  
100071, Тошкент, Қушбеги кўчаси, 6.