

Биологические свойства и вирулентность *Helicobacter pylori*

Исаева Г.Ш.^{1,2}, Валиева Р.И.^{1,2}

¹ ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Россия

² ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия

Контактный адрес:

Гузель Шавхатовна Исаева
Эл. почта: guisaeva@rambler.ru

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, факторы патогенности, вирулентность, цитотоксичность, адгезия, биопленки, гетерогенность.

В данном обзоре обобщены последние научные данные о биологических свойствах *Helicobacter pylori* (морфологических, культуральных, биохимических). Подробно описаны факторы патогенности *H. pylori*, отвечающие за колонизацию, адгезию, образование плёнок, агрессию и цитотоксичность, их значение в патогенезе заболеваний, а также возможные взаимосвязи с различными клиническими исходами инфекции. Также рассмотрены вопросы генетического разнообразия штаммов *H. pylori*, которое может быть важным фактором в развитии различных клинических проявлений и иметь значение для проведения эпидемиологических исследований.

Biological characteristics and virulence of *Helicobacter pylori*

Isaeva G.Sh.^{1,2}, Valieva R.I.^{1,2}

¹ Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Contacts:

Guzel Sh. Isaeva
E-mail: guisaeva@rambler.ru

Key words: *Helicobacter pylori*, pathogenicity factors, virulence, cytotoxicity, adhesion, biofilm, heterogeneity.

This review summarizes the most recent data on the biological characteristics of *Helicobacter pylori* (morphological, cultural, biochemical). *H. pylori* pathogenicity factors promoting colonization, adhesion, biofilm formation, aggression, and cytotoxicity, their contribution to the pathogenesis of diseases as well as the possible relationships with various clinical outcomes are described in detail. The genetic heterogeneity of *H. pylori* strains which can determine different clinical manifestations and have significance for conducting epidemiological studies is also considered.

История открытия *H. pylori* связана с изучением этиологии и патогенеза хронического гастрита и язвенной болезни. Впервые гипотеза об инфекционной природе этих заболеваний возникла в конце XIX – начале XX веков с появления в печати первых сообщений об обнаружении спиралевидных бактерий у собак в 1874 г. и у человека в 1906 г. Однако этиологическую роль этих бактерий в патогенезе заболеваний ЖКТ человека доказали только через сто лет. Австралийские исследователи Marshall В. и Warren R. в 1984 г. опубликовали сообщение об открытии и успешном культивировании новой бактерии, выделенной из биоптатов слизистой оболочки желудка у больных язвенной болезнью желудка и хроническим гастритом [1]. В 1985 г. эти микроорганизмы были включены в международную таксономию под названием *Campylobacter pyloridis*. По ультраструктуре, набору жирных кислот, последовательности РНК эти бактерии отличались от кампилобактеров, поэтому в 1989 г. они были выделены в отдельный род *Helicobacter* [2]. Этот термин отражает два морфологических признака *H. pylori*: *in vivo* они имеют спиралевидную (helical) форму, *in vitro* – палочковидную (bacter)

форму. В 2005 г. за открытие роли *H. pylori* в патогенезе хронического гастрита и язвенной болезни Warren R. и Marshall В. была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Согласно Определителю бактерий Берджи, *H. pylori* относят к I роду *Helicobacter* семейства *Helicobacteriaceae*. Это семейство, включающее 2 рода *Helicobacter* и *Wolinella*, относится к I порядку *Campylobacteriales* V класса *Epsilonproteobacteria*.

Биологические свойства *Helicobacter pylori*

Морфология, физиология

H. pylori – это грамотрицательные, неспорообразующие, спиралевидной формы бактерии длиной 2,2-5,0 мкм и диаметром 0,5-1 мкм с закругленными концами. *H. pylori* совершает движения за счет наличия на одном из полюсов от 2 до 6 жгутиков. Жгутики окружены мембраноподобным чехлом, защищающим их от деполаризации при низких значениях рН желудка [3]. Однополярность жгутиков *H. pylori* обеспечивает высо-

кий крутящий момент, необходимый для перемещения в вязкой среде желудка, и штопорообразную подвижность [4].

Имеющиеся данные указывают на существование трех морфологических форм: S-образные, C- и U-образные, кокковидные формы. *In vivo* и при оптимальных условиях культивирования *in vitro* *H. pylori* существует в виде S-образно изогнутой бактерии с 1-3 завитками и пучком из 5-7 жгутиков. Под влиянием неблагоприятных условий (температура, pH, недостаток питательных веществ, действие антибиотиков) микроорганизмы могут трансформироваться в кокковидные и дормантные формы [5]. Saito N. и соавт. (2003) выделили 3 типа кокковидных форм: нежизнеспособные, жизнеспособные культивируемые и некультивируемые [6]. C- и U-образные формы являются промежуточной формой при трансформации микроорганизма в неактивную (спящую) фазу при неблагоприятных условиях. Морфологические изменения сопровождаются снижением метаболической активности, в частности уреазной активности, но при этом гены, кодирующие ее синтез, продолжают выявляться [7]. Эти данные указывают на то, что процесс морфологической и биохимической трансформации носит фенотипический характер и не затрагивает генотип. Возможна также реверсия дормантных форм в вегетативные формы. При неблагоприятных условиях у *H. pylori* включаются адаптационные механизмы, направленные на сохранение вида, при этом промежуточные и кокковидные формы не теряют инфекционных свойств и способны вызывать рецидивы.

Культуральные свойства

H. pylori – микроаэрофилы (оптимальная концентрация кислорода – 3-15%) и капнофилы (оптимальная концентрация углекислого газа – 10-15%). Xia H. и соавт. (1994) получили культуру *H. pylori*, выросшую в аэробных условиях, но она отличалась меньшим размером колоний и низкой частотой деления микробных клеток [8]. Это противоречие можно объяснить феноменом: при низкой концентрации бактериальной популяции *H. pylori* являются микроаэрофилами, а при высокой могут расти в аэробных условиях [9].

H. pylori требовательны к питательным средам, в составе которых необходимо присутствие крови или сыворотки. На кровяном агаре дают рост через 2-5 суток в виде мелких (диаметром 1-2 мм), влажных, прозрачных колоний. Некоторые штаммы проявляют гемолитическую активность (α -гемолиз). Оптимальная температура роста составляет 37°C, но некоторые штаммы могут расти при +30°C и +42°C [10]. Оптимальное значение pH – нейтральное, ближе к слабощелочному (8,5).

H. pylori нуждаются в ряде готовых аминокислот, в частности в аргинине, гистидине, изолейцине, лейцине, метионине, фенилаланине, валине и серине, выступающих в качестве факторов роста и размножения. Они используют эти аминокислоты не только для синтеза белков, но и как основной источник энергии. Культивирование *H. pylori* можно осуществлять как на плотных, так и на жидких средах, но в связи с трудностью выделения этих бактерий на жидких средах на практике используют агары. Для культивирования *H. pylori* пред-

ложены различные среды, которые можно разделить условно на селективные и неселективные. В настоящее время для выделения *H. pylori* рекомендована комбинация неселективной и селективной сред или двух селективных. Обязательными компонентами сред являются базовый агар, ростовые добавки, а для селективных – ингибиторы роста сопутствующей микрофлоры (ванкомицин для ингибирования роста грамположительных кокков; полимиксин, налидиксовая кислота, колистин, триметоприм, цефсулодин для ингибирования роста грамотрицательных бактерий; нистатин, амфотерицин В для торможения роста грибов). *H. pylori* – очень прихотливый микроорганизм, требующий дополнительных факторов (витаминов, микроэлементов), усиливающих рост. Обязательным компонентом среды должна быть добавка 5-10% крови или сыворотки животных (лошади, барана). Использование крови человека ограничено наличием у большинства взрослого населения защитных антител, способных ингибировать рост *H. pylori*. При этом эритроциты могут быть лизированы, чтобы ростовые вещества могли быть использованы быстрее, что достигается при применении «шоколадного агара» (лизис эритроцитов происходит при нагревании крови, в связи с чем она приобретает цвет шоколада). Предложены другие ростовые добавки: яичный желток, уголь, крахмал, альбумин бычьей сыворотки, циклодекстрин [11-14]. Cellini L. и соавт. (1992) разработали среду с добавлением 2% изовиталекса и гемина (10 мг/л) [15]. Другая добавка – 2,3,5-трифенилтетразолинхлорид – способствует быстрой идентификации колоний *H. pylori*. В результате метаболического использования этого вещества бактерией оно превращается в нерастворимый формазан, и колонии *H. pylori* окрашиваются в золотистый цвет [16]. Jiang X. и соавт. (2000) в качестве ростовых добавок предложили использование сульфата железа, пирувата натрия и свиного муцина [17]. Для выделения *H. pylori* предложены дифференциально-диагностические среды, содержащие мочевины и индикатор [18, 19].

Сходный с плотными средами состав (основы, ростовые и селективные добавки), условия культивирования *H. pylori*, используются и в жидких средах, хотя этот процесс более трудоемок и в практических лабораториях не нашел широкого применения. Но способ культивирования *H. pylori* на жидких питательных средах незаменим в научных целях для изучения физиологии, метаболизма, экспрессии генов, кодирующих факторы патогенности. Его используют преимущественно при необходимости получения больших количеств микробной массы при субкультивировании для изучения ферментов, экзо- и эндотоксинов. Предложены различные основы жидких сред: *Brucella*-бульон, сердечно-мозговой бульон, соевый бульон с ростовыми добавками (сыворотка, дрожжевой экстракт, циклодекстрин и другие) и антимикробными препаратами (ванкомицин, налидиксовая кислота, амфотерицин В) [20-21]. Предложена среда, имеющая постоянный состав витаминов и микроэлементов без добавления сыворотки – serum-free Ham's F-12 [22]. При росте на жидких питательных средах бактерии имеют типичную извитую форму, подвижны и биохимически активны, полноценны в антигенном отношении.

Биохимические свойства

H. pylori продуцирует каталазу и оксидазу, однако описаны и каталазонегативные мутанты [23]. В большом количестве выделяют уреазу, не разлагают углеводы. Тесты на образование H_2S , восстановление нитратов в нитриты переменные. Выделяют щелочную фосфатазу, γ -глутамилтранспептидазу, лейцинаминопептидазу. Для дифференцировки от бактерий семейства *Campylobacteriaceae* используют тесты на определение способности *H. pylori* расти в присутствии 2,3,5-трифенилтетразолин хлорида (0,4 и 1 мг/л), селенита натрия (0,1%), глицина (1%); отсутствия роста в 8% растворе глюкозы и 3,5% хлорида натрия; чувствительности к цефалотину и устойчивости к налидиксовой кислоте.

H. pylori продуцирует широкий набор ферментов: уреазу, цитохромоксидазу, каталазу, щелочную фосфатазу, алкогольдегидрогеназу, липазу, γ -глутамилтранспептидазу, лейцинаминопептидазу, протеазы и липазы, но не выделяет сахаролитические ферменты. Метаболизм *H. pylori* обеспечивается энергией при разложении трикарбоновых кислот и аминокислот, но не углеводов. В ходе эволюции эта бактерия приобрела свойства, позволяющие ей выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды. *H. pylori* способен изменять условия своего микроокружения. В условиях кислой среды «включается» мощная система ощелачивания – происходит выработка уреазы в огромных количествах, но при pH=8 происходит гибель бактерии, поэтому в условиях нейтральной среды *H. pylori* «включает» систему оксидазных ферментов, которые при окислении субстрата приводят к выделению ионов водорода, что сдвигает pH в кислую сторону. Окислительные ферменты не только закисляют микроокружение *H. pylori*, но и продуцируют активные формы кислорода, повреждающие ткани слизистых оболочек. Таким образом, при pH <6 токсический эффект оказывает уреазы, а при изменении pH в щелочную сторону (что часто возникает на фоне применения антисекреторных препаратов) повреждающее действие оказывают оксидазы.

Факторы патогенности

H. pylori располагает широким набором факторов патогенности: адгезины, цитотоксины, ферменты агрессии, факторы, обеспечивающие защиту от бактерицидных систем макроорганизма и т.д.

Подвижность

Важнейшим фактором патогенности *H. pylori* является его способность колонизировать эпителий желудка и метапластически измененный эпителий 12-перстной кишки. Спиралевидная форма и наличие на одном полюсе жгутиков позволяет микроорганизму быстро передвигаться в толще слизи и проникать через межклеточные контакты. Роль подвижности в качестве фактора колонизации *H. pylori* была продемонстрирована в 1992 г. Eaton K. и соавт. [24] на гнотобионтах, когда у животных, зараженных подвижными штаммами *H. pylori*, отмечалась более высокая частота инфицирования в сравнении с животными, инфицированными

неподвижными мутантами. Жгутики *H. pylori* представлены комплексом белков – флагеллинами HpaA, FlaA, FlaB, FlaD, FlgK. Из них HpaA, FlaA, FlaB обнаружены у штаммов, выделенных от пациентов с желудочными заболеваниями. Эти флагеллины являются первичными мишенями в гуморальном иммунном ответе после инфицирования [25]. В структуру жгутиков входит комплекс белков, состоящих из FliM, FliN, FliG, FliY. Установлено, что мутанты FliM, FliG, FliY не способны продуцировать жгутики, а FliN мутанты способны синтезировать жгутики, но они дефектны, поэтому эти штаммы неподвижны [26]. *H. pylori* производит различные типы движения: «плавающие» – swimming (в жидкой среде), «скользящие» – spreading (в полужидком агаре), «ползающие» – swarming (на плотной среде). «Плавающая» подвижность может быть измерена средней скоростью движения бактерии в фазово-контрастном микроскопе. «Скользкая» и «ползающая» подвижность определяется путем измерения диаметра кольца роста вокруг точки инокуляции. При экспериментальном воспроизведении инфекции на животных моделях было установлено, что степень колонизации слизистой оболочки желудка положительно коррелирует с высокой подвижностью [27]. Последние исследования указывают на важную роль в колонизации *H. pylori* регулятора поглощения железа Fur, который регулирует ионный гомеостаз, окислительный ответ и жгутиковый механизм [28]. Другой недавно обнаруженный фактор – Dsb-подобный белок HPO231 – участвует в модуляции моторики, окислительно-восстановительном гомеостазе и имеет важное значение для колонизации желудка *H. pylori* [29].

Образование биопленок

Важным свойством бактерий является способность секретировать компоненты гликокаликса, что позволяет *H. pylori* образовывать биопленку и способствует колонизации эпителия и выживанию в неблагоприятных условиях [30]. Сплошное покрытие биопленкой слизистой оболочки желудка наблюдается у уреазоположительных пациентов, тогда как у уреазонегативных такое покрытие составляет менее 2% поверхности [31]. Способность этой бактерии формировать биопленку не связана с гидрофобностью клеточной стенки, подвижностью и аутоагрегацией [32], но является штамм-зависимым признаком [33]. Присутствие сыворотки в среде тормозит адгезию [34], а добавление муцина, напротив, повышает количество клеток *H. pylori* в виде просветных форм и снижает количество пленочных [30]. Образованию биопленки способствуют различные факторы окружающей среды, такие как благоприятная температура, pH, микроаэрофильные условия, субингибирующие концентрации антибиотиков [35].

Необходимо отметить, что в случаях формирования биопленок эрадикационная терапия может оказаться неэффективной, хотя *in vitro* штаммы *H. pylori* проявляют чувствительность к тем же препаратам. Исследование по изучению воздействия компонента N-ацетилцистеина подтвердило его способность разрушать биопленки, что указывает на то, что терапия, направленная на биопленки, может быть успешной для лечения *H. pylori*-ассоциированных заболеваний [36].

Адгезия

Адгезия *H. pylori* к эпителиальным клеткам желудка, облегчающая доступ бактерии к питательным веществам и доставку эффекторных молекул, является важнейшим фактором патогенности. Рецепторами для *H. pylori* являются молекулярные структуры, входящие в состав слизи: остатки сиаловых кислот, сульфогруппы гликопротеинов, гликолипидов, фосфолипидов и остатки фукозы льюисподобных антигенов, свойственных не только клеткам эпителия желудка, но и эритроцитам группы крови I(0). Показана также способность микроорганизма связываться с белками соединительной ткани, в частности с коллагеном, ламинином, витронектином и др. *H. pylori* обладает большим набором поверхностных мембранных белков – Нор (*H. pylori* outer membrane proteins), играющих важную роль в адгезии и адаптации к макроорганизму. Геном *H. pylori* содержит более чем 30 *omp* генов, которые можно разделить на 2 подгруппы: *hop* (*Helicobacter* outer membrane proteins) и *hor* (*hop*-related groups). Нор-подгруппа кодируется 21 генами и включает 2 известных адгезина: *babA* (Lewis blood group antigen-binding adhesion) и *sabA* (sialic Lewis X antigen-binding adhesion). Эти адгезины распознают специфические углеводные фрагменты желудочного эпителия, что способствует инфекции и воспалительным процессам в ЖКТ.

Белки *Bab* (blood group antigen-binding adhesion – адгезин, ассоциированный с группой крови), гены которых (*babA* и *babB*) присутствуют в виде нескольких аллелей, обуславливают адгезию *H. pylori* с системой антигенов Lewis на эпителиальных клетках желудка. *In vitro* было показано, что *H. pylori* специфически связывается со слизистой оболочкой желудка, и этот процесс регулируется фукозилированными антигенами этой группы. Некоторые исследователи указывают на то, что штаммы с высоким уровнем экспрессии *babA* определяют более серьезные повреждения слизистой и чаще ассоциированы с язвой желудка [37] и раком желудка [38]. В то же время, генотипическое разнообразие генов *babA* и *babB* может влиять на избирательность адгезии различных штаммов *H. pylori* [39]. Известно, что *babA*-опосредованное связывание является кислоточувствительным процессом, обратимым и реагирующим на повышение pH [40]. Белок *babA* играет роль в кислотной адаптации бактерии в ответ на изменения секреции соляной кислоты в ходе прогрессирования заболевания. Связывание *babA* с гликоконъюгатами ингибирует пролиферацию, вызванную бактериальной агрегацией, что указывает на новую роль муцина в защите хозяина против *H. pylori* [41].

Наружный воспалительный белок *oipA* (outer inflammatory protein) поддерживает воспаление слизистой оболочки желудка, связан с секрецией ИЛ-8 и ИЛ-6, степенью обсемененности *H. pylori*, выраженностью нейтрофильной инфильтрации, развитием интерстициальной метаплазии. Yamaoko Y. и соавт. (2006) обнаружили ассоциацию *oipA*-положительных штаммов с дуоденальной язвой и нейтрофильной инфильтрацией, тогда как *sabA* генотип был ассоциирован с раком желудка, кишечной метаплазией, атрофией тела желудка [42].

К адгезинам *H. pylori* также относят и NLBH

(neuraminyl lactose binding haemagglutinin, гемагглютинин, связывающий нейраминиллактозу), представляющий собой белок (3 кДа), который влияет на секрецию соляной кислоты париетальными клетками [43]. НраА (*H. pylori* adhesin A), представленный поверхностными липопротеинами *alpA* и *alpB*, обеспечивает прикрепление бактерии к эпителию желудка [44].

Кроме того, существуют и другие протеины, такие как *alpA* (*hopC*), *alpB* (*hopB*), *hopZ*, которые также принимают участие в адгезии и опосредуют тропизм *H. pylori* к слизистой желудка, но окончательно их роль пока не установлена [45, 46].

Уреаза

Важным фактором патогенности *H. pylori* является способность к образованию уреазы. Она представлена Ni^{2+} -зависимым ферментом, состоящим из субъединиц *ureA* (26,5 кДа) и *ureB* (60,3 кДа), которые образуют полную молекулу с молекулярной массой 540 кДа. Уреаза, состоящая из субъединиц *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureI*, является маркером инфекции *H. pylori* и фактором защиты микроорганизма от действия соляной кислоты, обеспечивает длительное персистирование *H. pylori* в желудке человека, усиливает воспалительные реакции посредством активации моноцитов, нейтрофилов, секреции цитокинов, образования свободных радикалов и окиси азота. Считается, что большая субъединица уреазы (*ureB*) действует как аттрактант для лейкоцитов. *H. pylori* производит огромное количество этого фермента, позволяющего нейтрализовать кислую среду и создавать вокруг бактерии микроокружение в виде «облака» из аммиака [47]. Объем ее образования достигает 10-15% от общего белка, синтезируемого *H. pylori*; кроме того, она имеет наивысшую активность среди бактериальных уреаз [48]. От других уреазоположительных бактерий *H. pylori* отличается образованием внеклеточной уреазы за счет аутолиза части клеток и адсорбции фермента на поверхности выживших бактерий. Будучи сильным антигеном уреазы связывает антитела, комплекс антиген-антитело удаляется с поверхности бактериальной клетки, тем самым, защищая *H. pylori* от лизиса. Ведущая роль уреазы в колонизации слизистой оболочки желудка была доказана на животных моделях, когда уреазо-негативные штаммы *H. pylori* были не способны колонизировать эпителий желудка гнотобионтов, даже после нейтрализации соляной кислотой [49].

Этот фермент имеет и другие важные функции. Уреаза действует на эпителиоциты как токсин: образующиеся ионы аммония способны разрушать плотные межклеточные контакты и повреждать эпителий. В частности, установлено его цитотоксическое действие на клетки эпителия желудка *in vitro* [50]. Уреаза также является индуктором острых и хронических клеточных ответов хозяина. Большая субъединица уреазы (*ureB*) стимулирует хемотаксис лейкоцитов. Взаимодействие аммиака с нейтрофилами стимулирует синтез миелопероксидазы, которая запускает ряд биохимических реакций с образованием высокотоксичных продуктов (перекись водорода, хлорноватистая кислота, монохлорамин и других), оказывающих повреждающее действие на слизистую оболочку желудка [51].

Дополнительным механизмом развития воспалительного ответа, опосредованным через его медиаторы, является способность уреазы *H. pylori* индуцировать агрегацию тромбоцитов с последующим запуском метаболизма арахидоновой кислоты по липооксигеназному пути [48]. Кроме того, уреазы участвуют в воспалительной реакции и способствуют адгезии, взаимодействуя с рецепторами CD74 желудочного эпителия [52].

Цитотоксичность

VacA (vacuolating-associated cytotoxin)

Цитотоксичность – важнейший фактор патогенности *H. pylori*. Последние исследования показывают, что *H. pylori* способствует повреждению эпителиальных клеток посредством выработки цитотоксинов *vacA* (vacuolating-associated cytotoxin) и *cagA* (cytotoxin-associated gene). Вакуолизирующий токсин *vacA* (140 кДа) кодируется геном *vacA*, существующим у всех штаммов *H. pylori*, и отображает аллельное разнообразие в трех основных регионах: «S» (signal – сигнальный), «I» (intermediate – промежуточный), «M» (middle – средний). Уровень секреции вакуолизирующего токсина определяется мозаичной структурой *vacA* гена. Регионы *vacA* существуют в двух аллельных типах – s1 и s2, i1 и i2, m1 и m2, что обуславливает различия между штаммами в цитотоксической активности. В s1 идентифицированы подтипы: s1a, s1b, s1c [53]. Штаммы *H. pylori*, имеющие генотипы s1m1 и s1m2, обладают максимальным или средним уровнем секреции цитотоксина, тогда как штаммы s2m2 проявляют незначительную токсическую активность [54]. Что касается «I» региона, то s1m2 генотипы, имеющие i1, являются вакуолизирующими, а штаммы s1m2, имеющие i2 аллель – невакуолизирующие [55]. Недавно Sinnott C. и соавт (2016) описали новый полиморфизм гена промежуточного региона *vacA* i1 подтипа, который ассоциирован с уровнем воспаления слизистой оболочки желудка у *H. pylori*-позитивных пациентов и повышением риска заболеваний [56]. Другое исследование сообщило о *vacA*-зависимом патогенетическом механизме, приводящем к фосфорилированию *cagA* на клеточной линии дуоденальной карциномы AZ-521 [57].

Вакуолизирующий токсин *vacA in vitro* вызывает формирование вакуолей в клетках. *In vivo* он вызывает образование эрозий и язв [58]. Этот цитотоксин увеличивает проницаемость мембран по отношению к анионам, достоверно уменьшает скорость реэпителизации экспериментальных язв и пролиферацию эпителиоцитов за счет нарушения функций клетки, связанных с целостностью её цитоскелета, пассивный транспорт мочевины через эпителиальные клетки желудка, влияет на выживание *H. pylori* в клетках хозяина, снижает содержание АТФ в эпителиоцитах, стимулирует апоптоз клеток. При низких значениях pH неактивные додекамеры *vacA* распадаются на мономеры, а при взаимодействии с фосфолипидным слоем восстанавливаются как гексамерные анион-селективные каналы. *VacA* изменяет работу протонных насосов и влияет на поток ионов, вызывая при этом накопление вакуолей в клетках, что приводит к

атрофии слизистой желудка [59]. Возможно, что образующиеся вакуоли защищают *H. pylori* от бактерицидного действия лизосом, что способствует персистенции бактерии [60]. *VacA* нарушает транспорт белков, увеличивает проницаемость мембран, повреждает цитоскелет, а также ингибирует опсонизацию бактерий, тем самым, нарушая нормальное функционирование защитных механизмов слизистой оболочки желудка. Кроме того, *vacA* стимулирует диффузию уреазы через эпителий, делая подслизистый слой доступным для действия фермента. Очищенный цитотоксин *vacA* ингибирует пролиферацию эпителиоцитов и уменьшает скорость заживления язв желудка [61, 62].

Штаммы с s1 аллелью секретируют активный токсин и ассоциированы с высоким риском развития язвы и рака желудка, а комбинация s1/s2 или s2 найдена у больных раком желудка [63]. Подтип m1 демонстрирует более сильную вакуолизирующую активность, чем подтип m2, и связан с повышенным риском повреждения эпителия желудка и канцерогенезом [64]. Также показано, что i1 аллель ассоциирована с аденокарциномой желудка [65]. Исследователями также установлено, что жители стран Латинской Америки, Ближнего Востока, Африки, инфицированные s1 или m1 штаммами *H. pylori*, имеют повышенный риск развития язвенной болезни и рака желудка в сравнении с лицами, инфицированными штаммами s2 и m2 [66]. Также имеются данные о наличии различий между штаммами в распространенности генотипов по географическому происхождению. Например, штаммы m1 распространены в странах Северо-Восточной Азии, таких как Япония, Южная Корея, а штаммы m2 преобладают в странах Юго-Восточной Азии, таких как Тайвань, Вьетнам, но при этом связь между развитием определённых заболеваний и географическим регионом не выявлена [67, 68].

CagA (cytotoxin-associated gene)

«Остров патогенности» *cag-PAI* у *H. pylori* – это регион хромосомной ДНК, содержащий приблизительно 31 ген, кодирующий белки IV секреторной системы *H. pylori* и разделенный на 2 региона: *cagI* и *cagII*. Цитотоксин *cagA*, маркер «острова патогенности» *H. pylori*, участвует в образовании язв, развитии атрофии, разрушении межклеточного матрикса и базальной мембраны, опухолевой инвазии и метастазировании посредством индукции комплекса uPA (urokinase-type plasminogen activator) и uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) в раковые клетки в желудке, стимуляции выработки ИЛ-8, способствует повышению активности антрального гастрита. Цитотоксины *cagC*, *cagE*, *cagH* стимулируют выработку ИЛ-8, а *cagF* вовлечен в процесс распознавания и доставки *cagA* в каналы T4SS (IV секреторной системы). Функция IV секреторной системы состоит в транспортировке эффекторных молекул бактерии к эукариотическим клеткам [69]. За перенос *cagA* непосредственно в эпителиоциты отвечают продукты генов, входящих в состав «островка патогенности» *cag-PAI*: прикрепляясь к мукоциту, подобно действию «молекулярного шприца», они впрыскивают в клетку *cagA*. После доставки в клетку хозяина продукт терминального гена «островка патогенности» (*cagA*) подвергается фос-

форилированию и активирует эукариотическую фосфатазу, что приводит к дефосфорилированию белков клетки хозяина и морфологическим изменениям [69, 70]. Этот фосфорилированный белок изменяет активность генов цитокинов, инициирующих фагоциты и, таким образом, вызывает индукцию ИЛ-8, а также мощную активацию нейтрофилов [71]. С активностью фосфорилированного *sagA* связывают транскрипцию ядерных генов, что объясняет высокую частоту возникновения рака желудка у людей, инфицированных *sagA*-положительными штаммами *H. pylori*, и его участие в канцерогенезе [72]. Наличие гена *sagA* ассоциировано с высоким уровнем воспаления, которое через цепь последовательных превращений приводит к более серьезным заболеваниям, таким как язва желудка и рак желудка [73]. Jang S. и соавт. (2017) сообщили, что некоторые штаммы *H. pylori* являются гетерогенными в отношении копий *sagA* (до 4 копий), расположенных в хромосоме, число которых может изменяться и непосредственно связано с токсичностью [74].

В западных странах сообщалось, что лица, инфицированные *sagA*-положительными штаммами, подвержены большему риску развития язвы и рака желудка, чем инфицированные *sagA*-негативными штаммами *H. pylori*. Однако у жителей стран Восточной Азии такой зависимости не установлено [75, 76]. Исследователями также обсуждается роль *sagA*-позитивных штаммов *H. pylori* при внежелудочных заболеваниях, например, при сердечно-сосудистой патологии [77], аутоиммунном поражении щитовидной железы [78].

Кроме того, *sagA* – это полиморфный ген, который представлен разным количеством повторяющихся последовательностей, расположенных в 3' регионе. Каждый повторяющийся регион *sagA* содержит Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) профили, включающие фосфорилирование тирозина. Согласно расшифрованным EPIYA последовательностям профиля, различают 4 сегмента: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C, EPIYA-D, каждый из которых содержит EPIYA-A повторяющийся регион. Но профили EPIYA последовательностей имеют географические особенности, чем можно объяснить различия в распространенности рака желудка в различных странах. Так, EPIYA-A повторяющийся регион *sagA* гена западных изолятов *H. pylori* ассоциирован с EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C сегментами (A-B-C тип *sagA*). EPIYA-C сегмент вариабельно повторяется (до 3 раз) в тандеме среди различных *sagA* штаммов. *SagA* штаммы, выделенные из восточноазиатских изолятов *H. pylori*, также содержат EPIYA-A и EPIYA-B сегменты, но без повторения EPIYA-C сегмента, вместо которого они имеют EPIYA-D сегмент, уникальный для этого региона. Соответственно, EPIYA-A повторяющийся регион *sagA* гена восточноазиатских изолятов *H. pylori* находится в ассоциации с EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-D сегментами (A-B-D тип *sagA*) [70]. Западные *sagA* штаммы, имеющие повторяющийся EPIYA-C сегмент, чаще ассоциированы с развитием предраковых изменений и раком желудка [79]. Данные, полученные при изучении роли повторяющегося региона, позволяют предположить, что штаммы *H. pylori*, имеющие эти повторяющиеся последовательности, менее устойчивы к действию соляной кислоты,

на что указывает их присутствие при атрофическом гастрите, при котором снижена её секреция. В исследовании Yamaoka Y. и соавт (2011) показано, что заболеваемость раком желудка наиболее высока в странах Восточной Азии, но она также высока и в некоторых странах Южной Америки, таких как Колумбия и Перу, где преимущественно циркулируют *sagA* штаммы. Однако при сравнительном изучении частоты встречаемости повторяющего EPIYA-C сегмента установлено, что 57% изолятов *H. pylori* из Колумбии имеют два EPIYA-C сегмента и только 4% изолятов из США, где частота рака желудка является одной из самых низких. Таким образом, распространённость EPIYA-C сегмента в популяции может быть одним из факторов, объясняющих наличие географических различий в распространённости рака желудка [80].

IceA (Induced by contact with epithelium)

У *H. pylori* описан белок IceA (Induced by contact with epithelium), кодируемый геном *iceA*. Он существует в двух аллельных вариантах: *iceA1* и *iceA2*. Ген *iceA1* регулирует взаимодействие *H. pylori* с клетками желудочного эпителия и проявляет гомологию с геном *Neisseria lactamica*, кодирующим специфическую эндонуклеазу рестрикции [81]. Ген *iceA2* не имеет гомологии с известными генами, функции его пока не установлены, но некоторые исследования указывают на его связь с неязвенной диспепсией. Согласно результатам исследования van Doorn L. и соавт. (1998), *iceA1* является маркером язвенной болезни желудка [75]. Сходные результаты описаны Shiota S. и соавт., согласно которым *iceA1* связан с развитием язвы желудка, независимо от *sagA* статуса [82]. В других исследованиях показана связь генотипа *iceA1* с усилением инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки желудка нейтрофилами, экспрессией ИЛ-8 и острым воспалением [83]. В малайзийском исследовании распространённость *iceA1* и *iceA2* была низкой, и не отмечалось достоверной корреляции между этими факторами патогенности, клинической формой патологии и индивидуальными особенностями пациентов [84]. Метаанализ, включавший 50 исследований, подтвердил связь между аллельным вариантом *iceA1* и *iceA2* и клиническими проявлениями, при этом распространённость *iceA1* была достоверно выше в Азии, чем в западных странах, в то время как *iceA2* был более распространен в последних [82].

DupA (Duodenal ulcer promoting gene)

У *H. pylori* открыт ген *dupA*, локализованный в плазмидном регионе генома, который первоначально был описан как маркер развития язвенной болезни 12-перстной кишки и защитный фактор от рака желудка [85]. Однако впоследствии другие исследователи показали, что он может быть связан с развитием рака желудка [86, 87], поэтому функция этого гена до конца не ясна. Возможно, он ассоциирован с повышением продукции ИЛ-8, выявленным в эпителиальных клетках желудка как *in vivo*, так и *in vitro*. Отсутствие этого гена у мутантов, как считают некоторые исследователи, может быть связано с повышенной восприимчивостью к низким зна-

чениям pH [85]. Результаты исследований о связи гена *dupA* с развитием дуоденальной язвы или рака желудка носят противоречивый характер. Так, Roesler B. и соавт. (2011) предположили наличие возможной связи между *dupA*, *vacA s1m1* и *cagA* положительными штаммами и развитием рака желудка [74]. Исследование, проведенное Wang M. и соавт. (2013), показало связь этого гена с высоким риском развития рака желудка в странах Восточной Азии: у всех изолятов от онкологических пациентов было обнаружено наличие *cagA*, у 31% из них – *dupA* в ассоциации с *vacA* генотипом, что может определять высокий риск развития аденокарциномы желудка в этом регионе [88].

Напротив, Schmidt H. и соавт. (2009) не выявили достоверных различий между наличием этого гена у изолятов, полученных от пациентов с дуоденальной язвой, раком желудка и неязвенной диспепсией [87]. Сходные результаты были получены в двух других исследованиях [89, 90]. Метаанализ и систематический обзор подтвердили важность гена *dupA* в развитии язвенной болезни 12-перстной кишки, но не выявили взаимосвязи между язвой и раком желудка [91, 92]. Возможно, что генетическое разнообразие *H. pylori* способствует адаптации микроорганизма к генетически различным этническим группам и обуславливает разнообразие клинических проявлений инфекции [93].

Гетерогенность

Штаммы *H. pylori* отличаются большим разнообразием [94, 95]. Генетическая гетерогенность *H. pylori* должна рассматриваться в двух аспектах: микроразнообразии и макроразнообразии. Микроразнообразие является результатом спонтанных точечных мутаций, в большинстве случаев они являются «молчащими». Накоплению мутаций способствует хроническое течение инфекции. Принципиально важным является то, что мутациям чаще подвергаются гены, ответственные за адаптацию *H. pylori* к организму человека, а гены, необходимые для жизнеобеспечения бактерии, относительно стабильны [96]. Макроразнообразие возникает в результате генетических рекомбинаций. По данным Garcia-Vallve S. и соавт. (2000), основная роль в генетическом многообразии принадлежит именно рекомбинациям [97]. В частности, гены «островка патогенности» *cag-PAI* *H. pylori* приобрел в результате горизонтальной передачи от других видов бактерий. Исследователи отмечают наличие корреляции между генотипом штамма и его географическим происхождением [98]. Крайний полиморфизм штаммов *H. pylori*, изолируемых в различных географических регионах, может свидетельствовать о недавней адаптации этого микроорганизма к организму человека. Модель, предложенная Berg D. (1999), объясняет географическое разнообразие штаммов [99]. Штаммы *H. pylori*, имея общее генетическое происхождение, следуя за миграцией человека, разделились на 2 группы: азиатскую и западную, – и развивались независимо друг от друга. Эта гипотеза, поддержанная работой Suerbaum S. и соавт. (1998), предлагает разделение *H. pylori* на основе

разновидностей генотипов *cagA* и *vacA* на 7 типов и подтипов [94]. Попадая в организм человека, *H. pylori* приспосабливает свой генотип к организму хозяина и происходит «селективный отбор» наиболее адаптированных штаммов.

Однако штаммы *H. pylori* генетически неоднородны не только на популяционном уровне, но и на уровне одного организма и даже органа. Частота встречаемости этого феномена достаточно высока. Большой процент смешанных генотипов можно соотнести с уровнем инфицирования населения: чем выше частота инфицирования, тем выше процент смешанных генотипов, что подтверждают исследования португальских исследователей, где уровень инфицированности населения *H. pylori* составляет более 80%, а процент смешанных генотипов по *vacA* – 37% и *iceA* – 36,7% [100]. Так, Finger S. и соавт. (2006) обнаружили присутствие более одного штамма *H. pylori* у половины из 63 обследованных пациентов [101]. Описаны случаи одновременного присутствия у одного пациента *cagA*-положительных и *cagA*-отрицательных изолятов [102-104]. Этот феномен может быть вызван делецией части или всего «островка патогенности». С помощью гибридизации *in situ* была обнаружена корреляция между *cagA* и колонизацией слизистой оболочки желудка: *cagA*-отрицательные штаммы колонизируют апикальную часть эпителиальных клеток, а *cagA*-положительные – межклеточное пространство [105].

Результаты генотипирования штаммов *H. pylori* позволяют спрогнозировать не только эпидемиологические показатели заболеваний, ассоциированных с *H. pylori*, но и предсказать их динамику в результате лечения. Большой научный интерес представляет изучение чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам и факторов патогенности [106]. Пюрвеева К.И. и соавт. (2003) при изучении неудачных случаев эрадикации выявили зависимость между генотипами *H. pylori* и наличием генов резистентности к кларитромицину [107]. De Francesco V. и соавт. (2006) обнаружили взаимосвязь между *cagA* и *vacA* статусом *H. pylori* и резистентностью к кларитромицину с помощью ПЦР в реальном времени [108]. Группа исследователей из ОАЭ под руководством Mubarak S. (2007) сообщила, что мутации A(2142/43) G гена резистентности к кларитромицину строго ассоциированы с генами патогенности *cagA* и *vacA* [109]. Исследования в этой области позволят выделять группу или группы больных с определенными генотипами, у которых имеется высокий риск неудачной эрадикации, и разработать мероприятия, позволяющие этого избежать.

Заключение

Изучению биологических свойств *H. pylori* посвящено большое количество исследований, но, несмотря на накопленные знания, остаётся много неясных вопросов, особенно касающихся факторов патогенности и развития клинических проявлений. Надеемся, что продолжающиеся и будущие исследования должны помочь расшифровать значение инфекции *H. pylori* в патогенезе заболеваний ЖКТ и внежелудочных проявлений.

Литература

1. Marshall B.J., Warren L.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311-1315.
2. Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*. 1989;39:397-405.
3. Radin J.N., Gaddy J.A., Gonzalez-Rivera C., et al. Flagellar localization of a *Helicobacter pylori* autotransporter protein. *MBio*. 2013;4(2):e00613-12.
4. Qin Z., Lin W.T., Zhu S., Franco A.T., Liu J. Imaging the motility and chemotaxis machineries in *Helicobacter pylori* by cryo-electron tomography. *J Bacteriol*. 2016;pii:JB.00695-16.
5. Willen R., Carlen B., Wang X., et al. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid form. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability. *Ups J Med Sci*. 2000;105(1):31-40.
6. Saito N., Konishi K., Sato F., et al. Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability. *J Infect*. 2003;46:49-55.
7. Can F., Karahan C., Dolapci I., et al. Urease activity and urea gene sequencing of coccoid forms of *H. pylori* induced by different factors. *Curr Microbiol*. 2008;56:150-155.
8. Xia H.X., Keane C.T., O'Morain C.A. Culture of *Helicobacter pylori* under aerobic conditions on solid media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:406-409.
9. Bury-Mone S., Kaakoush N.O., Asencio C., et al. Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? *Helicobacter*. 2006;11:296-303.
10. Mégraud F., Bonnet F., Garnier M., Lamouliatte H. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol*. 1985;22:1007-1010.
11. Westblom T.U., Madan E., Midkiff B.R. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1991;29:819-821.
12. Hazell S.L., Markesich D.C., Evans D.J., Evans D.G., Graham D.Y. Influence of media supplements on growth and survival of *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8:597-602.
13. Buck G.E., Smith J.S. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Microbiol*. 1987;25:597-599.
14. Olivieri R., Bugnoli M., Armellini D. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J Clin Microbiol*. 1993;31:160-162.
15. Cellini L., Allocati N., Piccolomini R., et al. New plate medium for growth and detection of urease activity of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1351-1353.
16. Queiroz D.M., Mendes E.N., Rocha G.A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1987;25:2378-2379.
17. Jiang X.P., Doyle M.P. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1984-1987.
18. Degnan A.J., Sonzogni W.C., Standridge J.H. Development of a Plating Medium for Selection of *Helicobacter pylori* from Water Samples. *Applied Environment Microbiol*. 2003;69(5):2914-2918.
19. Isaeva G., Pozdeev O.K. Domestic chromogenic medium for isolation of *Helicobacter pylori*. *Klin Lab Diagn*. 2009;8:35-37.
20. Murano A., Miyake M., Kato J., et al. Enhancement of the growth of *Helicobacter pylori* in Brucella broth by hydrogen peroxide. *Microbiol Immunol*. 1999;43(11):1009-1015.
21. Morshed M.G., Karita M., Konishi H., Okita K., Nakazawa T. Growth medium containing cyclodextrin and low concentration of horse serum for cultivation of *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 1994;38(11):897-900.
22. Tee W., Fairley S., Smallwood R., et al. Comparative evaluation of three selective media and a nonselective medium for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2587-2589.
23. Westblom T.U., Phadnis S., Langenberg W., et al. Catalase negative mutants of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11:522-526.
24. Eaton K.A., Morgan D.R., Krakowka S. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 1992;37(2):123-127.
25. Tang R.X., Luo D.J., Sun A.H., Yan J. Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(30):4816-4822.
26. Lowenthal A.C., Hill M., Sycuro L.K., et al. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* flagellar switch proteins. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7147-7156.
27. McGee D.J., Langford M.L., Watson E.L., et al. Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants. *Infect Immun*. 2005;73(3):1820-1827.
28. Lee A.Y., Kao C.Y., Wang Y.K., et al. Inactivation of ferric uptake regulator (Fur) attenuates *Helicobacter pylori* J99 motility by disturbing the flagellar motor switch and autoinducer-2 production. *Helicobacter*. 2017;22(4):e12388.
29. Zhong Y., Andert F., Kruse T., et al. *Helicobacter pylori* HP0231 influences bacterial virulence and essential for gastric colonization. *PLoS One*. 2016;11:e0154643.
30. Cole S.P., Harwood J., Lee R., et al. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2003;186(10):3124-3132.
31. Coticchia J.M., Sugawa C., Tran V.R., et al. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. *J Gastrointest Surg*. 2006;10:883-889.
32. Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., et al. Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(Suppl. 1):S90-S94.
33. Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., et al. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2009;9:197.
34. Williams J.C., McInnis K.A., Testerman T.L. Adherence of *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces is influenced by serum. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:1255-1258.
35. Attaran B., Falsafi T. Identification of factors associated with biofilm formation ability in the clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Iran J Biotechnol*. 2017;15(1):58-66.
36. Cammarota G., Branca G., Ardito F., et al. Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:817-820.
37. Fujimoto S., Olaniyi O., Arnqvist A., et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:49-58.
38. Abadi A., Taghvaei T., Mobarez A., Vaira G., Vaira D. High correlation of babA2-positive strains of *Helicobacter pylori* with the presence of gastric cancer. *Intern Emerg Med*. 2013;8(6):497-501.
39. Colbeck J.C., Hansen L.M., Fong J.M., et al. Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 2006;74:4375-4378.
40. Bugaytsova J.A., Bjornham O., Chernov Y.A., et al. *Helicobacter pylori* adapts to chronic infection and gastric disease via pH-responsive BabA-mediated adherence. *Cell Host Microbe*. 2017;21:376-389.
41. Skoog E.C., Padra M., Aberg A., et al. BabA dependent binding of *Helicobacter pylori* to human gastric mucins cause aggregation that inhibits proliferation and is regulated via ArsS. *Sci Rep*. 2017;7:40656.
42. Yamaoka Y., Ojo O., Fujimoto S., et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*. 2006;55:775-781.
43. Ogura K., Maeda S., Nakao M., et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med*. 2000;192(11):1601-1610.

44. Lundstrom A.M., Blom K., Sundaeus V., Bolin I. HpaA shows variable surface localization but the gene expression is similar in different *Helicobacter pylori* strains. *Microb Pathog.* 2001;31:243-253.
45. Odenbreit S., Swoboda K., Barwig I., et al. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun.* 2009;77(9):3782-3790.
46. Dossunbekova A., Prinz C., Mages J., et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis.* 2006;194(10):1346-1355.
47. Ha N.C., Oh S.T., Sung J.Y., et al. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol.* 2001;8:505-509.
48. Olivera-Severo D., Wassermann G.E., Carlini C.R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(7):851-861.
49. Mine T., Muraoka H., Saika T., Kobayashi I. Characteristics of a clinical isolate of urease-negative *Helicobacter pylori* and its ability to induce gastric ulcers in Mongolian gerbils. *Helicobacter.* 2005;10(2):125-131.
50. Fan X., Gunasena H., Cheng Z., et al. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *Immunology.* 2000;165:1918-1924.
51. Tanahashi T., Kita M., Kodama T., et al. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2000;68:664-671.
52. Mascellino M.T., Margani M., Oliva A. *Helicobacter pylori*: determinant and markers of virulence. *Dis Markers.* 2009;27(3):137-156.
53. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M.J., et al. Mosaicium in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995;28:17771-17777.
54. Cover T.L., Blaser M.J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1992;267:10570-10575.
55. Rhead J.L., Letley D.P., Mohammadi M., et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology.* 2007;133(3):926-936.
56. Sinnett C.G., Letley D.P., Narayanan G.L., et al. *Helicobacter pylori* vacA transcription is genetically-determined and stratifies the level of human gastric inflammation and atrophy. *J Clin Pathol.* 2016;69:968-973.
57. Nukano M., Yahiro K., Yamasaki E., et al. *Helicobacter pylori* VacA acting through receptor protein tyrosin phosphatase alpha is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Dis Model Mech.* 2016;9:1473-1481.
58. Shirasaka D. *Helicobacter pylori* VacA and gastric ulcer. *Int J Hematol.* 2006;84:316-318.
59. Gebert B., Fischer W., Weiss E., Hoffmann R., Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.* 2003;301:1099-1102.
60. Terebiznik M.R., Vazquez C.L., Torbicki K., et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2006;74:6599-6614.
61. Miehke S., Kirsch C., AghaAmiri K., et al. The *Helicobacter pylori* vacA sI, mI genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer.* 2000;87:322-327.
62. Miehke S., Yu J., Schuppler M., et al. *Helicobacter pylori* vac A, ice A, and cagA status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(4):1008-1013.
63. Lopez-Vidal Y., Ponce-de-Leon S., Castillo-Rojas G., Barreto-Zuniga R., Torre-Delgadillo A. High diversity of vacA and cagA *Helicobacter pylori* genotypes in patients with and without gastric cancer. *PLoS One.* 2008;3:e3849.
64. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(11):629-641.
65. Basso D., Zambon C.F., Letley D.P., et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2008;135(1):91-99.
66. Sugimoto M., Yamaoka Y. The association of vacA genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(9):835-842.
67. Uchida T., Nguyen L.T., Takayama A., et al. Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population. *BMC Microbiol.* 2009;9:175.
68. Ogiwara H., Graham D.Y., Yamaoka Y. vacA i-region subtyping. *Gastroenterology.* 2008;134(4):1267.
69. Odenbreit S., Puls J., Sedlmaier B., et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 2000;287:1497-1500.
70. Higashi H., Tsutsumi R., Muto S., et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science.* 2002;295(5555):683-686.
71. Brandt S., Kwok T., Hartig R., Konig W., Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9300-9305.
72. Chow W.H., Blaser M.J., Blot W.J., et al. An inverse relation between cagA strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:588-590.
73. Roesler B.M., Costa S.C.B., Zeitune J.M.R. Virulence factors of *Helicobacter pylori* and their relationship with the development of early and advanced distal intestinal type gastric adenocarcinoma. In: Tonino P., editor. *Gastritis and Gastric Cancer. New Insights in Gastroprotection, Diagnosis and Treatments.* Rijeka Croatia: InTech Publishers; 2011.
74. Jang S., Su H., Blum F.C., et al. Dynamic expansion and contraction of CagA copy number in *Helicobacter* impact development of gastric disease. *MBio.* 2017;8(1):pii:e01779-16.
75. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1998;115(1):58-66.
76. Yamaoka Y., Kodama T., Gutierrez O., et al. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol.* 1999;37(7):2274-2279.
77. Schöttker B., Adamu M.A., Weck M.N., Müller H., Brenner H. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and major cardiovascular events: a population-based cohort study. *Atherosclerosis.* 2012;220(2):569-574.
78. Shi W.J., Liu W., Zhou X.Y., Ye F., Zhang G.X. Associations of *Helicobacter pylori* infection and cytotoxin-associated gene A status with autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Thyroid.* 2013;23(10):1294-1300.
79. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 2009;44(4):239-248.
80. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;7(11):629-641.
81. Xu Q., Morgan R.D., Roberts R.J., et al. Functional analysis of iceA1, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(17):3839-3847.
82. Shiota S., Watada M., Osamu M., et al. *Helicobacter pylori* iceA, clinical outcomes, and correlation with cagA: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(1).
83. Peek R.M., Jr., Tompson S.A., Donahue J.P., et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998;110(6):531-544.
84. Amjad N., Osman H.A., Razak N.A., et al. Clinical significance of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genotype status. *World J Gastroenterol.* 2010;16(35):4443-4447.

85. Lu H., Hsu P., Graham D.Y., Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2005;128(4):833-848.
86. Argent R.H., Burette A., Miendje Deyi V.Y., Atherton J.C. The presence of dupA in *Helicobacter pylori* is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China or North America. *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1204-1206.
87. Schmidt H.M.A., Andres S., Kaakoush N.O., et al. The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (dupA) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study. *Gut Pathog*. 2009;1(1):5-13.
88. Wang M.Y., Chen C., Gao X.Z., et al. Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. *Microb Pathog*. 2013:59-60.
89. Gomes L.I., Rocha G.A., Rocha A.M.C., et al. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with dupA-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *Int J Med Microbiol*. 2008;298(3-4):223-230.
90. Pacheco A.R., Proença-Módena J.L., Sales A.L.L., et al. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and cag pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(11):1053-1059.
91. Douraghi M., Mohammadi M., Oghalaie A., et al. dupA as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol*. 2008;57(pt 5):554-562.
92. Shiota S., Matsunari O., Watada M., Hanada K., Yamaoka Y. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* dupA gene and clinical outcomes. *Gut Pathog*. 2010;2(1):13.
93. Gressmann H., Linz B., Ghai R., et al. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet*. 2005;1(4):e43.
94. Suerbaum S. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*. 2000;290:175-181.
95. Nishikawa H., Hayashi T., Arisaka F., et al. Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b. *Sci Rep*. 2016;6:30031.
96. Owen R.E. The genome: viewpoint of biologist. *Curr Opin Gastroenterol*. 1998;14(Suppl. 1):S1-S3.
97. Garcia-Vallve S., Romeu A., Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res*. 2000;110:1719-1725.
98. Valmaseda Perez T., Gisbert J.P., Pajares Garcia J.M. Geographic differences and the role of cagA gene in gastroduodenal diseases associated with *Helicobacter pylori* infection. *Rev Esp Enferm Dig*. 2001;93(7):471-480.
99. Berg D.E. Variabilité génomique de *Helicobacter pylori*: étendue, signification. *La Lettre de l'Infectiologue*. 1999;3(Suppl. 1):9-15.
100. Figueiredo C., Van Doorn L.J., Nogueira C., et al. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *J Gastroenterol*. 2001;36(2):128-135.
101. Finger S.A., Velapatiño B., Kosek M., et al. Effectiveness of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR and random amplified polymorphic DNA fingerprinting for *Helicobacter pylori* strain differentiation. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:4713-4716.
102. Daugule I., Rumba I., Engstrand L., Ejderhamn J. Infection with cagA-positive and cagA-negative types of *Helicobacter pylori* among children and adolescents with gastrointestinal symptoms in Latvia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22:622-624.
103. Fantry G.T., Zheng Q.X., Darwin P.E., Rosenstein A.H., James S.P. Mixed infection with cagA-positive and cagA-negative strains of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 1996;1:98-106.
104. Tomasini M.L., Zanussi S., Sozzi M., et al. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 2003;41:976-980.
105. Camorlinga-Ponce M., Romo C., Gonzalez-Valencia G., et al. Topographical localisation of cagA positive and cagA negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an *in situ* hybridisation study. *J Clin Pathol*. 2004;57:822-828.
106. Godoy A.P., Ribeiro M.L., Benvengo Y.H., et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol*. 2003;3:20.
107. Pjurveeva K.V., Lapina T.L., Momynaliev K.T., et al. Genotyping in the clinical practice of patients with duodenum peptic ulcer. *Rossiiskij zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2003;13(3):21-24. Russian. (Пюрвеева К.В., Лапина Т.Л., Момыналиев К.Т. и соавт. Генотипирование в клинической практике ведения больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2003;13(3):21-24.
108. De Francesco V., Margiotta M., Zulla A., et al. Clarithromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. *J Microbiol*. 2006;28:6-13.
109. Mubarak S.A., Adeel Islam A., Abida A.E. Analysis of *Helicobacter pylori* antimicrobial susceptibility and virulence genes in gastric mucosal biopsies in the United Arab Emirates. *Indian J Gastroenterol*. 2007;26:221-224.