

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Е.Н.Кроткова

24.11.2021 г.

Регистрационный № 139 – 1121

**Метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса
Helicobacter pylori с определением концентрации цитокинов
интерлейкина-6 и интерлейкина-10
(инструкция по применению)**

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», учреждение здравоохранения «Гомельский областной клинический онкологический диспансер»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Воропаев Е.В., д.м.н., доцент Стома И.О., Осипкина О.В., Ковалев А.А., к.м.н., доцент Ачинович С.Л., Зятков А.А., Шафорост А.С., Назарчук Ю.А.

Гомель, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) изложен метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) с определением концентрации цитокинов (интерлейкина-6 и интерлейкина-10) в сыворотке (плазме) крови у пациентов с болезнями желудка и двенадцатиперстной кишки, который может быть использован в качестве дополнительного диагностического критерия.

Метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *H.pylori* с определением концентрации цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-10 может быть использован в комплексе медицинских услуг, с целью медицинской профилактики развития злокачественных новообразований желудка, связанных с инфекционным процессом, вызванным доминирующими в Республике Беларусь штаммами *H.pylori*.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-онкологов, врачей-гастроэнтерологов и врачей иных специальностей, оказывающих медицинскую помощь профильным пациентам в стационарных и амбулаторных условиях.

Показания к применению: болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (K25-K28); гастрит и дуоденит (K29); другие болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (K31); злокачественное новообразование желудка (C16- C16.9).

Противопоказания к применению: отсутствуют.

Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

Таблица 1 — Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетического анализа (Набор оборудования для проведения молекулярно-генетического и иммуноферментного анализа)

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная центрифуга (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10-+99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
УФ-стерилизатор, или его аналог
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
<i>Проведение электорофоретической детекции</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
УФ- трансиллюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером
<i>Проведение иммуноферментного анализа</i>

Микропланшетный фотометр
Термошейкер
Промыватель планшетов автоматический с комплектующими
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл)
Комплект пипеточных дозаторов 8-канальных (5-50 мкл, 30-300 мкл; 100-1000 мкл)

Также необходимы следующие изделия медицинского назначения: ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера); микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; наконечники с фильтром объемом 10, 20, 200, 1000 мкл; наконечники без фильтра; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок и др.

Для проведения молекулярно-генетических исследований необходимы: наборы реагентов для экстракции и очистки ДНК, для амплификации и электрофоретической детекции. Для проведения ИФА необходимы соответствующие наборы реагентов.

Описание технологии использования метода с указанием этапов

Этапы:

1) **Получение и транспортировка биологического материала** (биоптаты слизистой оболочки желудка, сыворотка (плазма) крови) проводится в соответствии с правилами для проведения молекулярно-биологических и иммунологических исследований.

2) **Экстракция ДНК.** Выделение ДНК можно проводить с использованием готовых коммерческих наборов.

3) **Проведение ПЦР.** Для выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori* использованы праймеры, структура которых приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
CagA-прямой	gataacaggcaagcttttgaggga	349
CagA-обратный	ctgcaaaaagattgtttggcaga	пар нуклеотидов (п.н.)

Программа для проведения ПЦР: денатурация 1 цикл - 95°C, 3 мин; 42 цикла (95°C - 20 с, 55°C - 20с, 72°C – 20 с); финальная элонгация 1 цикл 72°C – 2 мин.

4) **Электрофоретическая детекция.** В результате ПЦР в образцах амплифицируется специфический фрагмент размером 349 п.н. гена *CagA Helicobacter pylori*. Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 1.

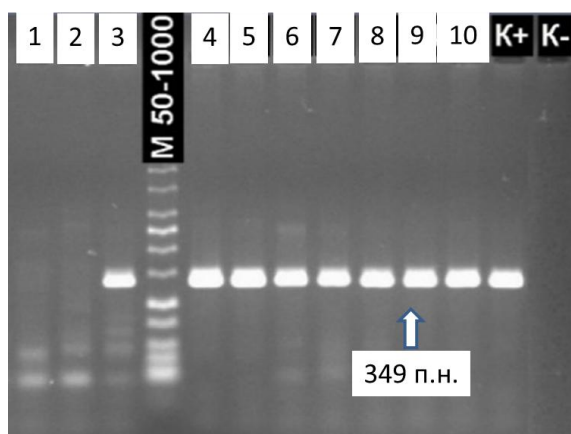


Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР, амплифицирован фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*

Как видно на рисунке 1, в образцах № 3-10 выявлен фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*, в образцах 1, 2 – не выявлен. Для верификации используется положительный K+ и отрицательный контроли K-, представляющие образцы, в которых доказано наличие или отсутствие фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*. При корректной работе

контролей делают вывод о наличии или отсутствии фрагмента гена CagA *Helicobacter pylori* в каждом из тестируемых образцов.

5) **Проведение ИФА.** Концентрацию интерлейкина-6 и интерлейкина-10 в сыворотке (плазме) крови пациентов определяют с применением микропланшетного фотометра, используя коммерческие наборы реагентов согласно инструкции производителя.

6) **Интерпретация результатов.** Для интерпретации результатов используется модель логистической регрессии и ROC-анализ, показавшие статистическую значимость при обработке результатов. Диагностическая модель логистической регрессии имеет вид (формула 1):

$$p = e^{-3,25 + 1,14 \text{ CagA} + 0,073 * \text{ИЛ-6} + 0,06 * \text{ИЛ-10}} / (1 + e^{-3,25 + 1,14 \text{ CagA} + 0,073 * \text{ИЛ-6} + 0,06 * \text{ИЛ-10}})$$

Формула размещена по адресу: <https://gsmu.by/upload/calcCancer/calc.html>

формула 1

где p – вероятность наличия у пациента злокачественных новообразований желудка,

CagA – наличие или отсутствие фрагмента гена CagA *Helicobacter pylori*, обозначаемое «1» или «0», соответственно;

ИЛ-6 – значение концентрации интерлейкина-6, выраженное в пг/мл;

ИЛ-10 – значение концентрации концентрации интерлейкина-10, выраженное в пг/мл.

По формуле 1 необходимо рассчитать значение p для каждого пациента, используя переменные CagA, ИЛ-6, ИЛ-10, полученные при проведении анализа.

Значение p , полученное при расчете по формуле 1, необходимо сравнить с пороговым значением, равным 0,263 (согласно ROC-кривой полученной модели, представлено на рисунке 2).

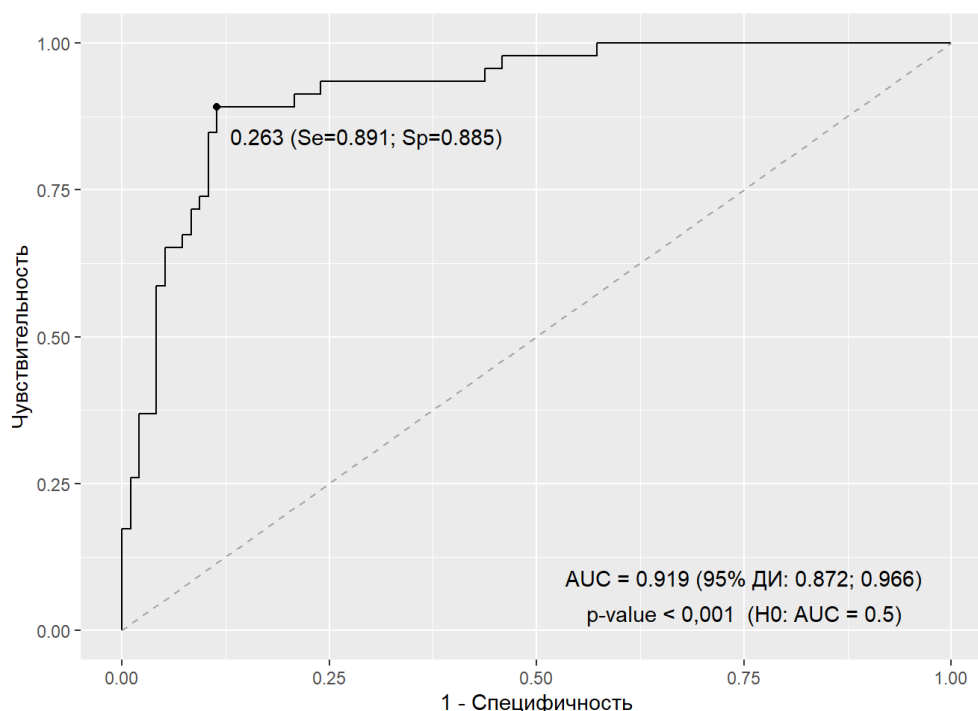


Рисунок 2 – ROC-кривая оценки модели логистической регрессии

Для интерпретации результатов использовать таблицу 3.

Таблица 3 – Интерпретация результатов

Сравнение расчетного и порогового значения p	Интерпретация
Расчетное значение $p > 0,263$	Онконастороженность Пациент нуждается в обязательном углубленном обследовании и дополнительном диспансерном наблюдении (Z03.1 «Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль»)
Расчетное значение $p < 0,263$	Другие заболевания ЖКТ (K25-K28, K29, K31), не являющиеся злокачественными новообразованиями желудка

Согласно ROC-кривой (видно из рисунка 2), полученная модель имеет высокую прогностическую способность. Специфичность составляет 88,5%, чувствительность – 89,1%.

Заключение

Метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *H.pylori* с определением концентрации цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 может быть применен в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний желудочно-кишечного тракта.

При получении расчетного значения $p > 0,263$ делают вывод о высокой онконастороженности и необходимости обязательного углубленного обследования и дополнительного диспансерного наблюдения пациента (Z03.1 «Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль»).

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Для правильной организации высококачественных молекулярно-генетических исследований необходимо строгое соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Нарушение этих правил – причина появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Одновременно с опытными образцами в каждом эксперименте должны использоваться специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты. Для обеспечения получения правильных результатов ИФА необходимо строгое соблюдение инструкции производителя и выполнение основных правил при проведении анализа, обеспечивающих достоверность и воспроизводимость.

**Обоснование целесообразности практического использования
метода оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *Helicobacter
pylori* с определением концентрации
цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-10**

Рак желудка возникает в результате ряда генетических, эпигенетических и метаболических изменений в продуцирующих слизь клетках на внутренней поверхности слизистой оболочки желудка [1]. Клетки рака желудка экспрессируют множество факторов роста и систем рецепторов цитокинов, которые образуют очень сложную сеть взаимодействия между раковыми клетками и стромальными клетками в микроокружении опухоли и придают опухолям желудка терапевтически устойчивый фенотип. Хотя кратковременная колонизация *Helicobacter pylori* слизистой оболочки желудка протекает бессимптомно [2], примерно у 10% пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*, развиваются пептические язвы, и не более чем у 3% – онкологические заболевания [3]. Стойкая колонизация слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* значительно увеличивает вероятность развития патологических процессов в желудке [4]. Примечательно, что предраковые поражения, опосредованные инфекцией *Helicobacter pylori*, имеют иммунопатологическое происхождение [5].

Одним из ключевых генов, являющихся значимыми предикторами неблагоприятных клинических исходов, связанных с онкогенным потенциалом *Helicobacter pylori* является цитотоксин-ассоциированный ген А (CagA) [6]. Взаимодействие факторов вирулентности, генетических факторов хозяина и факторов окружающей среды способствует патогенезу, связанному с *Helicobacter pylori*. Хотя гастрит вызывается всеми штаммами *Helicobacter pylori*, но не все штаммы *Helicobacter pylori*

способны вызывать карциному желудка. Только штаммы *Helicobacter pylori*, содержащие CAG PAI (CagA+) увеличивает вероятность развития рака желудка [7]. Ген CagA, *Helicobacter pylori*, вызывает генетическую нестабильность в клетках слизистой оболочки желудка, обычно модулируя активность различных генов [8].

Иммунный ответ на инфекцию *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке желудка обычно связан с высвобождением воспалительных и противовоспалительных цитокинов из различных типов иммунных клеток, таких как Th1, Th2, Th17, макрофаги, моноциты, тучные клетки и нейтрофилы. Многие из этих цитокинов, такие как интерлейкин (ИЛ)1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17, ИЛ-23, TNF- α , TGF- β , IFN- γ , CXCL12 и CXCL4, секретируются как в очаге инфекции, так и в общем кровообращении [9]. Специфические мембранные рецепторы экспрессируются эпителиальными клетками желудка, которые помогают передавать сигнал, переносимый различными цитокинами, внутрь клетки [10]. Цитокины действуют на широкий спектр типов клеток, где они связываются со своими родственными мембранными рецепторами и модулируют нижестоящие эффекторы в сигнальном каскаде [11].

Механизм действия цитокинов в онкогенезе может быть связан с действием определённых киназ, запускающих фосфорилирование активаторов транскрипции, например STAT3, который после фосфорилирования проникает в ядро и связывается со специфическими регуляторными последовательностями для активации или репрессии транскрипции генов-мишеней. В то же время, помимо действия в качестве фактора транскрипции, STAT3 действует как маркер прогрессирования карциномы желудка [12].

Таким образом, разработка дополнительного критерия на оценки онкогенного потенциала *Helicobacter pylori* для формирования целевой

группы с использованием доступных лабораторных методов диагностики, представляет значимый интерес для практической медицины.

Литература:

1. Jan I, Rather RA, Mushtaq I, et al. Helicobacter pylori Subdues Cytokine Signaling to Alter Mucosal Inflammation via Hypermethylation of Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene During Gastric Carcinogenesis. *Front Oncol.* 2021; 10:604747. Published 2021 Jan 25.
2. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Peek RM Jr, Blaser MJ *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan; 2(1):28-37.
3. Helicobacter infection and gastric neoplasia. Peek RM Jr, Crabtree JE *J Pathol.* 2006 Jan; 208(2):233-48.
4. Helicobacter infection and gastric neoplasia. Peek RM Jr, Crabtree JE *J Pathol.* 2006 Jan; 208(2):233-48.
5. Tolerance rather than immunity protects from Helicobacter pylori-induced gastric preneoplasia. Arnold IC, Lee JY, Amieva MR, Roers A, Flavell RA, Sparwasser T, Müller A *Gastroenterology.* 2011 Jan; 140(1):199-209.
6. The Prevalence of Helicobacter pylori in Estonian Bariatric Surgery Patients. Šebunova N, Štšepetova J, Sillakivi T, Mändar R *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 24; 19(2).
7. Salt intake and Helicobacter pylori infection. Beevers DG, Lip GY, Blann AD *J Hypertens.* 2004 Aug; 22(8):1475-7.
8. An Update on Helicobacter pylori as the Cause of Gastric Cancer. Zhang W, Lu H, Graham DY *Gastrointest Tumors.* 2014 Aug; 1(3):155-65.
9. Immune Response in *H. pylori*-Associated Gastritis and Gastric Cancer. Niu Q, Zhu J, Yu X, Feng T, Ji H, Li Y, Zhang W, Hu B *Gastroenterol Res Pract.* 2020; 2020():9342563.

10. CD8(+) T cells that produce interleukin-17 regulate myeloid-derived suppressor cells and are associated with survival time of patients with gastric cancer. Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, Shi Y, Mao XH, Chen W, Pang KC, Liu XF, Liu T, Zhang JY, Zeng H, Liu KY, Guo G, Tong WD, Shi Y, Tang B, Li N, Yu S, Luo P, Zhang WJ, Lu DS, Yu PW, Zou QM *Gastroenterology*. 2012 Oct; 143(4):951-62.e8.

11. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. Bockerstett KA, DiPaolo RJ *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul; 4(1):47-53.

12. Pandey A, Tripathi SC, Shukla S, Mahata S, Vishnoi K, Misra SP, et al. Differentially localized survivin and STAT3 as markers of gastric cancer progression: Association with *Helicobacter pylori*. 1 (2018) 1:e1004. 10.1002/cnr2.1004.