

## ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ *HELICOBACTER PYLORI* ΔРАІ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

© М. О. Анিকেенок,<sup>1</sup> О. Н. Ильинская

Кафедра микробиологии Казанского государственного университета;

<sup>1</sup> электронный адрес: marina.anikeenok@gmail.com

Одним из факторов, индуцирующих развитие раковых заболеваний, является хроническая инфекция *Helicobacter pylori*. Механизм действия бактерии на ДНК клетки хозяина полностью не выяснен. В настоящей работе был исследован генотоксический потенциал двух штаммов *H. pylori*: дикого типа *H. pylori* P12 и мутанта, не несущего «островка» патогенности, — *H. pylori* ΔРАІ на клетках HeLa (карцинома эндометрия) и AGS (карцинома желудка). Повреждение ДНК определяли с помощью метода ДНК-комет в нейтральных условиях по параметру момента хвоста «кометы». Показано, что оба штамма *H. pylori* не вызывали повреждения ДНК в клетках HeLa и AGS при различном количестве бактерий на клетку (от 20 до 500) в течение 6 ч инфицирования. В клетках AGS также не было обнаружено повреждения ДНК после 12 ч, однако после 24 ч инфекции клеток карциномы желудка мутантным штаммом *H. pylori* ΔРАІ наблюдалось резкое увеличение момента хвоста «кометы», в то время как у штамма дикого типа *H. pylori* P12 генотоксических эффектов не обнаружено.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, генотоксичность, метод ДНК-комет, канцерогенез.

Принятые сокращения: ТМ — Tail Moment, момент хвоста «кометы», АФК — активные формы кислорода.

Инфицирование *Helicobacter pylori* приводит к увеличению риска не только язвенной болезни, но и рака желудка (Webb et al., 1996; Kuipers, 1998; Ивашкин, Лапина, 2000; Goldblum et al., 2002). В развитых странах до 75 % случаев рака желудка, а в развивающихся странах около 90 % связано с инфекцией *H. pylori* (Forman, 1996). В 1994 г. Международное агентство по изучению рака отнесло хеликобактерную инфекцию к канцерогенам первого порядка (IARC, 1994).

Различные штаммы *H. pylori* различаются по патогенности. Доказано, что штаммы, содержащие ген *cagA*, вызывают выраженное воспаление и усиленную продукцию цитокинов (Grabtree, 1996). Они содержат наиболее значимый фактор вирулентности, так называемый островок патогенности *cag* (*cag pathogenicity island* — *cagPAI*), который является генетически вариабельным участком генома, ответственным за адгезию микроорганизма к слизистой оболочке желудка (Mizushima et al., 2002) и ряд других патогенных свойств, которые могут привести к развитию рака желудка (Watanabe et al., 1998; Montecucco, Rappuoli, 2001).

Однако молекулярный механизм действия *H. pylori* как канцерогена до конца не выяснен. Неизвестно, синтезирует ли *H. pylori* мутагенные или канцерогенные факторы, повреждает ли бактерия напрямую ДНК клетки хозяина или является непрямым канцерогеном, вызывая посредством образования генотоксических метаболитов, в частности свободных радикалов, мутации в клетках эпителия, приводящие к кишечной метаплазии и атрофическому гастриту.

Одним из современных прямых методов определения генотоксичности является метод гель-электрофореза изолированных клеток или ДНК-комет (Comet Assay). Этот метод впервые был предложен в 1984 г. для оценки индуцированных радиацией ДНК-повреждений в клетках млекопитающих (Östling, Johanson, 1984). Метод основан на регистрации различной подвижности поврежденной ДНК лизированных клеток, заключенных в агарозный гель под действием постоянного электрического поля. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, параметры которого зависят от степени поврежденности исследуемой ДНК.

Целью настоящей работы явилось выявление повреждения ДНК клеток карцином желудка и эндометрия при инфицировании их штаммами *H. pylori*, различных по островку патогенности *cagPAI*.

### Материал и методика

Эксперименты проводили на двух линиях опухолевых клеток человека: HeLa (карцинома эндометрия) и AGS — ATCC CRL 1739 (аденокарцинома желудка) из коллекции Института инфекционной биологии им. Макса Планка (Берлин). Клетки культивировали в 6-луночных планшетах в среде RPMI-1640 (Invitrogen, Германия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biocrom, Германия), в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Клетки инфицировали штаммом *Helicobacter pylori* P12 *cag+*, *vac+*, выделенным из биоптата пациента с язвой

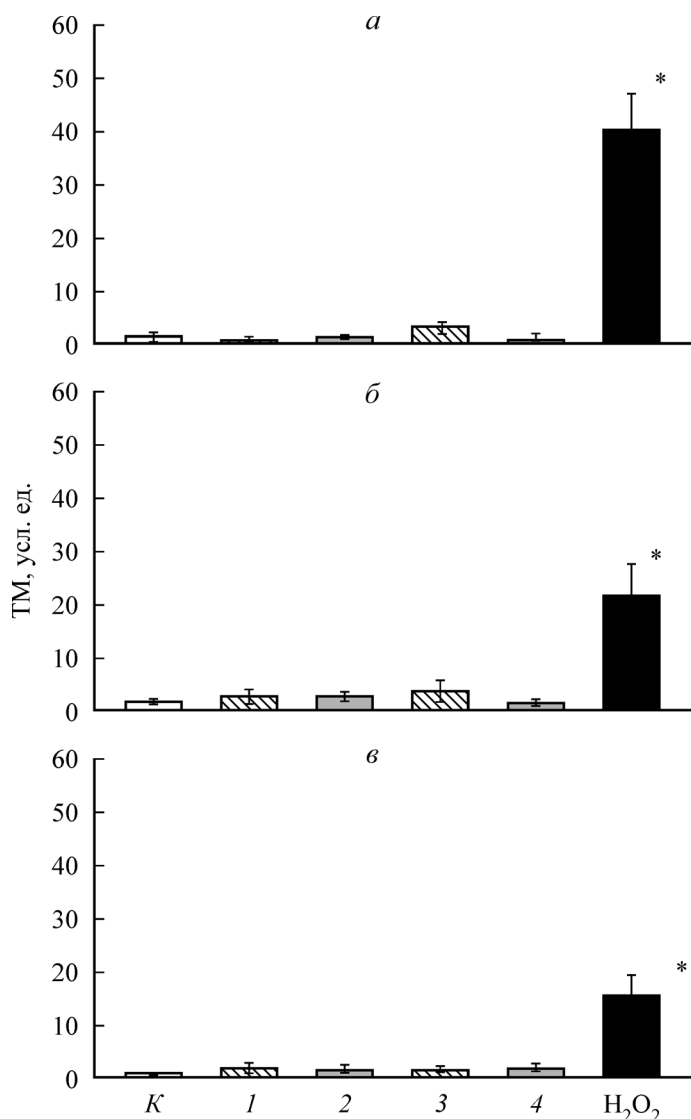


Рис. 1. Значение момента хвоста «кометы» ТМ после инфицирования клеток HeLa штаммами *Helicobacter pylori*.

а — инфекция 1 ч, б — инфекция 3 ч, в — инфекция 6 ч. Заштрихованные столбики — инфекция *H. pylori* P12, серые — *H. pylori* ΔРАI; К — интактные клетки, контроль; 1, 2 — 200 бактерий на клетку; 3, 4 — 500 бактерий на клетку; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — обработка перекисью водорода. Звездочка —  $P < 0.001$ .

двенадцатиперстной кишки (Schmitt, Haas, 1994), и мутантом *H. pylori* ΔРАI, дефектным по наличию островка патогенности (Odenbreit et al., 2001). Бактерии выращивали при 37 °С на L-агаре, содержащем ванкомицин (10 мкг/мл), в анаэробных условиях в атмосфере смеси газов Camrupogen — 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> и 85 % N<sub>2</sub> (Oxoid, Германия).

Перед инфицированием бактерии инкубировали 18 ч в жидкой питательной среде ВНИ, содержащей антибиотики ванкомицин (10 мкг/мл), триметоприм (1.25 мкг/мл) и неостатин (1 мкг/мл) для дикого типа *H. pylori* P12 и ванкомицин (10 мкг/мл), триметоприм (1.25 мкг/мл), неостатин (1 мкг/мл) и каномидин (8 мкг/мл) для *H. pylori* ΔРАI. Бактерии ресуспендировали в PBS и добавляли к клеткам HeLa и AGS в различной концентрации — от 20 до 500 бактерий на 1 клетку. Число жизнеспособных клеток определяли после окрашивания культуры в течение 2 мин трипановым синим в счетной камере с помощью микроскопа.

Генотоксический эффект оценивали по количеству поврежденной ДНК в геноме с помощью метода нейтральных ДНК-комет, используя Comet Assay Kit (Trevigen, США). Суспензию клеток в PBS ( $1 \cdot 10^5$  кл./мл) смешивали с агарозой и наносили на предметное стекло. Препараты выдерживали 20 мин в темноте при 4 °С и погружали в сосуд, заполненный лизирующим раствором (Lysis Solution, Trevigen), на 40 мин. Затем стекла с лизированными клетками погружали на 30 мин в щелочной раствор, pH > 13, отмывали 2 раза по 5 мин ТВЕ-буфером и помещали в камеру для горизонтального электрофореза. Электрофорез проводили при 1 В/см в течение 10 мин при комнатной температуре. По окончании электрофоретического разделения препараты переносили в 70%-ный раствор этанола на 5 мин, высушивали на воздухе и окрашивали раствором SYBR Green 1. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (Nikon Microphot-FX) при длинах волн возбуждения и регистрации 494 и 521 нм соответственно. Изображение «комет» обрабатывали, используя программы CometScore. В каждом варианте подсчитывали не менее 50 клеток. В качестве позитивного контроля использовали клетки, обработанные 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 20 мин при 4 °С.

Генотоксичность микроорганизмов определяли по одному из наиболее используемых информативных параметров — моменту хвоста «кометы» (ТМ, Tail Moment), который рассчитывали как произведение процентного содержания ДНК в «хвосте» на длину «хвоста» в условных единицах (Olive et al., 1990, 1992).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 5.11 с использованием непараметрического критерия Колмогорова—Смирнова в качестве критерия достоверности. При этом  $P < 0.05$  принимали за достоверный уровень значимости.

## Результаты и обсуждение

Повреждение клеток эукариот при хеликобактерной инфекции во многом зависит от длительности инкубирования клеток хозяина с бактериями. Длительная инфекция приводит к гибели части клеток. Мы установили, что в течение инфекции, длящейся 6 ч, не наблюдается гибели клеток и отсутствуют повреждения ДНК, о чем свидетельствуют одинаковые значения ТМ в опытном варианте, где клетки инкубировали с *H. pylori* P12 и *H. pylori* ΔРАI, и контрольном — без инкубации с бактериями (рис. 1). При этом схожие данные получены на клетках AGS, где значения ТМ после 3 ч инкубирования с *H. pylori* P12 и *H. pylori* ΔРАI (200 бактерий на клетку) составляли 1.65 и 0.83, а после 9 ч — 4.17 и 3.74 соответственно, что сопоставимо с результатами, полученными на клетках HeLa (рис. 1, б, в). Поскольку разница в чувствительности клеток отсутствовала, в дальнейшем мы проводили эксперименты с культурой AGS (аденокарцинома желудка), которая наиболее часто используется для изучения воздействия *H. pylori* на клетки человека in vitro.

Создание более длительного развития инфекции, до 12 ч инкубирования бактерий с клетками хозяина, требует уменьшения количества бактерий во избежание массовой гибели клеток. В связи с этим мы снизили исходное количество бактерий в 10 раз. После 12 ч инфицирования не наблюдали превышения гибели клеток в опытных вариантах с обоими штаммами по сравнению с неинфици-

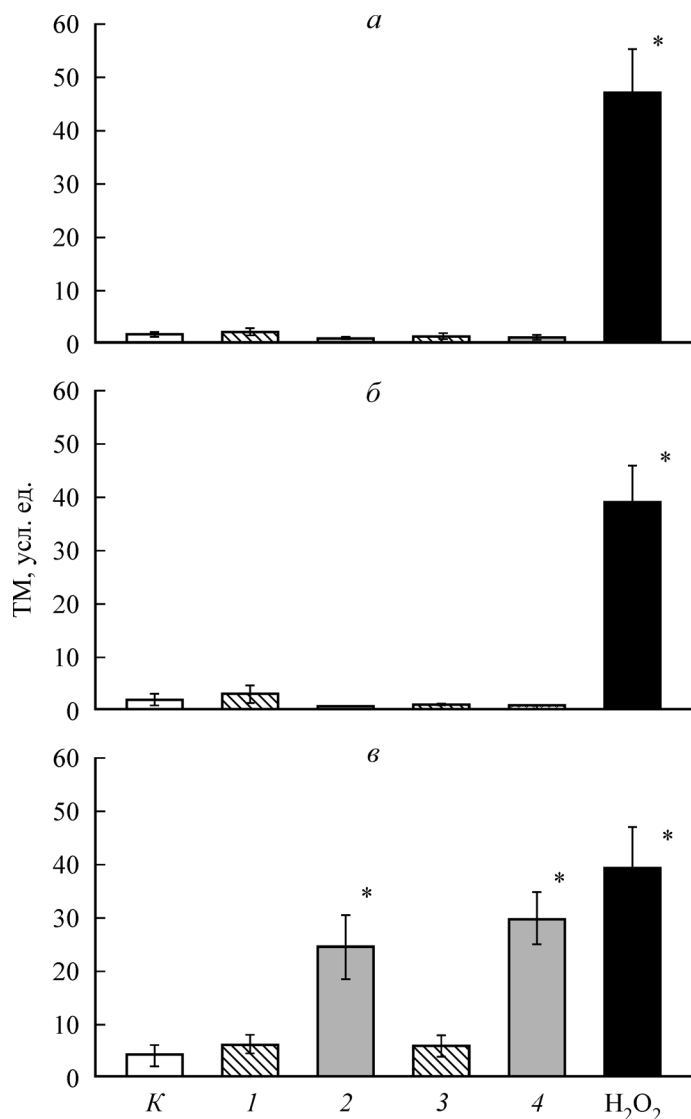


Рис. 2. Значение момента хвоста «кометы» ТМ после инфицирования клеток AGS штаммами *Helicobacter pylori*.

а — инфекция 6 ч, б — инфекция 12 ч, в — инфекция 24 ч. Заштрихованные столбики — инфекция *H. pylori* P12, серые — *H. pylori* ΔPAI; К — интактные клетки, контроль; 1, 2 — 20 бактерий на клетку; 3, 4 — 50 бактерий на клетку; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — обработка перекисью водорода. Звездочка —  $P < 0.001$ .

рованными клетками. Также не возросли значения ТМ, что говорит об отсутствии генотоксического эффекта патогена в данных условиях инкубации (рис. 2, б).

Культивирование клеток с бактериями в течение 24 ч привело к гибели около половины клеток в случае *H. pylori* P12, в то время как в контрольной и инфицированной мутантным штаммом *H. pylori* ΔPAI популяциях гибели не наблюдали. Это объясняется более агрессивным поведением бактерии дикого типа по отношению к хозяину, чем мутантного, у которого отсутствует островок патогенности *cag*, участвующий в усилении воспалительного процесса (Peek et al., 1995), в активации транскрипционных факторов и сигнальных путей (Naumann et al., 1999). Также известно, что бактерия, несущая *cagPAI*, индуцирует более высокий уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках эпителия желудка, приводящих к их повреждению, чем штамм ΔPAI (Ding et al., 2007). Однако именно инфицирование клеток *H. pylori* ΔPAI в течение

24 ч неожиданно выявило увеличение значений ТМ по сравнению с *H. pylori* P12 (рис. 2, в).

В ходе экспериментов разницы в повреждении ДНК интактных и инфицированных хеликобактером клеток, за исключением 24-часового инфицирования клеток AGS *H. pylori* ΔPAI, не выявлено. Вероятно, повреждение ДНК, которое появляется в результате длительной хеликобактерной инфекции и приводит к необратимым изменениям, возникает в небольшом количестве клеток. Кроме того, незначительные, функционально значимые повреждения ДНК невозможно детектировать методом ДНК-комет. Скорее всего, массовое повреждение ДНК, выявленное этим методом, можно обнаружить только как результат длительной хронической инфекции. Это подтверждают последние данные о значительном увеличении длины хвоста «кометы» при инфицировании хеликобактером *Mongolian gerbils* в течение 1—6 мес (Velazquez-Guadarrama et al., 2007).

Наши данные свидетельствуют о том, что после инфицирования *H. pylori* ΔPAI в течение 24 ч выявляется резкое увеличение значений ТМ в клетках AGS (рис. 2, в). По-видимому, это является следствием накопления генотоксических метаболитов, предположительно АФК, что происходит и при инфицировании диким штаммом *H. pylori* P12 в тех же условиях. Однако, поскольку наиболее поврежденные клетки погибали, детекция поврежденных ДНК в последнем случае не представлялась возможной.

Таким образом, длительная инфекция *H. pylori* (более 24 ч), несомненно, приводит к значительным повреждениям генетического аппарата клеток. Роль островка патогенности *cag* в данном процессе вряд ли значительна, поскольку и дефектный штамм вызывает повреждения ДНК. Синтез и проникновение в клетку белков, кодируемых цитотоксинассоциированным геном *cagA*, вызывает апоптотический каскад протеинкиназных реакций, приводящих к непосредственной гибели клеток, поэтому повреждения ДНК после инфицирования диким типом *H. pylori* не зафиксировано.

Результаты настоящей работы свидетельствуют об особой опасности хронических инфекций маловирулентными штаммами *H. pylori*.

Авторы выражают благодарность директору Института инфекционной биологии им. Макса Планка г. Берлина проф. Т. Ф. Майеру за предоставление штаммов и клеточных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК «Развитие научного потенциала высшей школы» (РНП 2.1.1.1005), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01051) и персонального гранта Палаты депутатов г. Берлина.

#### Список литературы

- Ивашкин В. Т., Лапина Т. Л. 2000. Гастроэнтерология XXI века. РМЖ. 17 : 697—703.
- Ding S. Z., Minohara Y., Fan X. J., Wang J., Reyes V. E., Patel J., Diren-Kramer B., Boldogh I., Ernst P. B., Crowe S. E. 2007. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. 75 : 4030—4039.
- Forman D. 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 220 : 23—26.
- Goldblum J. R., Richter J. E., Vaezi M., Falk G. W., Rice T. W., Peek R. M. 2002. *Helicobacter pylori* infection, not gastroesopha-

geal reflux, in the major cause of inflammation and intestinal metaplasia of gastric cardiac mucosa. *Amer. J. Gastroenterol.* 97 : 302—311.

Grabtree J. E. 1996. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 : 29—37.

IARC. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7—14 June 1994. IARC. Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 61 : 1—241.

Kuipers E. J. 1998. Review article: relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12 (Suppl. 1) : 25—36.

Mizushima T., Sugiyama T., Kabayashi T., Komatsu Y., Ishizuka J., Kato M., Asaka M. 2002. Decreased adherence of cagG — deleted *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells in Japanese clinical isolates. *Helicobacter*. 7 : 22—29.

Montecucco C., Rappuoli R. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews*. 2 : 457—466.

Naumann M., Wessler S., Bartsch C., Wieland B., Covacci A., Haas R., Meyer T. F. 1999. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J. Biol. Chem.* 274 : 31 655—31 662.

Odenbreit S., Gebert B., Püls J., Fischer W., Haas R. 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* 3 : 21—32.

Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat. Res.* 122 : 86—94.

Olive P. L., Wlodek D., Durand R. E., Banath J. P. 1992. Factors influence DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 198 : 259—260.

Östling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132 : 291—298.

Peek R. M., Jr., Miller G. G., Tham K. Y., Perez-Perez G. I., Zhao X., Atherton J. C., Blaser M. J. 1995. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab. Invest.* 71 : 760—770.

Schmitt W., Haas R. 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12 : 307—319.

Velazquez-Guadarrama N., Olivares A., Valencia P., De los Monteros L., Maadrigal-Santillan E., Madrigal-Bujaidar E. 2007. Genotoxic and oxidative damage induced by *Helicobacter pylori* in *Meriones unguiculatus*. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 26 : 39—49.

Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki H., Nakao M. 1998. *Helicobacter pylori* infection induced gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*. 115 : 642—648.

Webb P. M., Yu M. C., Forman D. 1996. An apparent lack of association between *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer in China. *Int. J. Cancer.* 67 : 603—607.

Поступила 24 VI 2008

#### GENOTOXICITY OF *HELICOBACTER PYLORI* ΔPAI IN DNA COMET ASSAY

M. O. Anikeenok,<sup>1</sup> O. N. Ilinskaya

Department of Microbiology, Kazan State University;

<sup>1</sup> e-mail: marina.anikeenok@gmail.com

Chronic infection with *Helicobacter pylori* is a factor inducing development of cancer diseases. The mechanism of its action on the «host» DNA is still not clear. In present study we investigate genotoxic potential of two strains of *H. pylori*: wild type *H. pylori* P12 and PAI-deficient mutant *H. pylori* ΔPAI. DNA damage was detected by DNA comet assay in gastric adenocarcinoma (AGS) and epithelial adenocarcinoma (HeLa) cells under neutral conditions using Tail Moment as a quantitative parameter. It was shown, that infection of AGS and HeLa cells with both strains *H. pylori* at different multiplicity of infection (20—500) for 6 h and infection of AGS for 12 h did not induce DNA damage. Our results revealed a significant dose-dependent increasing of Tail Moment in the AGS cells after infection with mutant *H. pylori* ΔPAI for 24 h, while genotoxicity of wild type *H. pylori* P12 under the same conditions was not observed.

Key words: *Helicobacter pylori*, genotoxicity, DNA comet assay, carcinogenesis.