Монгол оронд тархсан хеликобактерийн хэв шинжийг тодорхойлсон дүн

А.Оюунбаатар[1], Ч.Баттогтох[1], Н.Энхгэрэл[1], Бергит Хенрих[2], А.Аварзэд[3]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Бичил амь судлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхим
[2]ХБНГУ, Дюсселдорфын Хейнрих-Хейнагийн Их сургууль, Анагаахын микробиологи, Эрүүл ахуйн институт
[3]Олон улсын цахим сургалтын төв
Цахим шуудан: Oyunbaatar@mnums.edu.mn, Утас: 99103441

Түлхүүр үг:
CagA уураг
EPIYA полиморфизм
Барууны хэв шинж

Товч утга:
Үндэслэл: Дэлхийн хүн амын талаас их нь хеликобактерийн халдварт өртсөн байдаг бөгөөд хөгжиж буй орнуудад тархалт илүү өндөр байна. Т.Цэрэнтогтох нарын судлаачдын ходоодны үрэвсэлтэй болон хавдартай өвчтнүүдэд хийсэн судалгаанд EPIYA хэв шинжийг тодорхойлсон бөгөөд барууны хэв шинж дийлэнх хувьд нь илэрсэн (95.8%) ба ABC хэв шинжүүд нь ходоодны үрэвсэлтэй (n=142/341) болон хавдартай (n=11/17) өвчтнүүдэд хамгийн элбэг илэрсэн байна. **Зорилго:** Бидний судалгаа нь Монгол улсын 18 аймагт амьдарч буй ходоодны хавдаргүй өвчтнөөс ялгаж авсан хеликобактерийн омгийн EPIYA хэв шинжийг тодорхойлох зорилгын хүрээнд зонхилон тохиолдох хэв шинж, тархвар зүйг тодорхойлсон. **Арга, аргачлал:** Судалгаанд оролцогчдын ходоод дурандах үед авсан биопсийн эдийг задалж хеликобактери өсгөвөрлөх сонгомол тэжээлт орчинд өсгөвөрлөж, өсгөврөөс ДНХ ялгах оношлуурын дагуу ДНХ ялгаж *CagA* генийг илрүүлэх ПГУ-ийн шинжилгээ хийсэн. ПГУ-ийн бүтээгдэхүүнд нуклейн хүчлийн дараалал тодорхойлох шинжилгээ хийж, *CagA* гений EPIYA хэвшинжийг тодорхойлсон. **Үр дүн:** Судалгаанд оролцогчдын 1/3 нь эрэгтэйчүүд ба дундаж наслалт 47.13±10.07 байсан бол, 2/3 нь эмэгтэйчүүд ба дундаж наслалт 48.58±9.42 байв. Оролцогчдын дийлэнх хувь нь ходоодны үрэвсэлтэй (n=49/61 (80.33%)), цөөн хувь нь ходоодны шархтай (n=12/61 (19.67%)) байсан ба хүйсийн хувьд статистик ялгаа ажиглагдсангүй(p>0.05). Судалгаанд хамрагдсан нийт омгийн зөвхөн 107 омог ABD зураглал бүхий EPIYA хэсэгтэй зүүний хэв шинжийн *cagA* ген агуулж байсан. Үлдсэн 52 хеликобактерийн омог нь барууны хэв шинжид хамрагдах ба үүнээс 59.6% (n=31/52) нь зөхөн нэг EPIYA-C хэсэгтэй барууны I хэв шинжид, 38.5% (n=20/52) нь олон EPIYA-C хэсэгтэй барууны II хэв шинжийг тус тус агуулж байв. Барууны I хэв шинжийн *CagA* гений ихэнх нь (n=30/31) ABC зураглал бүхий EPIYA хэсэгтэй байсан бол барууны II хэв шинжийн *CagA* гений ихэнх (n=19/20) нь ABCC зураглал бүхий EPIYA хэсэгтэй тодорхойлогдсон. Судалгааны явцад ABCCCC, AAABC болон AAAAB гэсэн 3 ховор тохиолдох EPIYA зураглал бүртгэгдсэн.**Дүгнэлт:** Монгол оронд тархсан хелибактерийн омог нь барууны хэв шинжийн CagA давамгайлж байгаа бөгөөд хамгийн түгээмэл тохиолдох ABC болон ABCC дэд төрлүүдтэй байна. Манай судалгаагаар EPIYA-A баялаг AAABC болон AAAAB хоёр дэд хэв шинжийг анх удаа илрүүлсэн ба эдгээр хэв шинжийг халдварын эмгэг жамд бага нөлөөтэй гэж үздэг боловч цаашид *in-vivo* судалгаагаар уургийн түвшинд баталгаажуулах шаардлагатай байна.

Үндэслэл: Дэлхий даяар нийт 4.4 тэрбум хүн буюу дэлхийн хүн амын талаас их нь Хеликобактерийн халдвар авсан ба хөгжиж буй орнуудад тархалт илүү өндөр байна.[1] Хеликобактери нь грам сөрөг, мушгиа хэлбэртэй, микроаэрофиль бактери бөгөөд ходоодны салстын эпитель эсийг гэмтээдэг.[2] Цөөнгүй судалгаанд дурдсанаар Хеликобактери нь ходоодны архаг эсвэл хатангиршилт гастрит, ходоод болон 12 хуруу гэдэсний шарх, ходоодны аденокарцинома, салст-хамааралтай тунгалгийн эдийн лимфома (MALT) зэргийн түгээмэл

тохиолдох шалтгаан болдог байна.[3-4] Колонизаци болон эмгэг жам нь үндсэн 4 хоруу чанарын хүчин зүйлээр тодорхойлогддог. Ходоодны хүчиллэг орчинд амьдрах чадварыг уреазын идэвхи, хучуур эс рүү флагеллийн тусламжтай орох, эзэн эсэд адгезины тусламжтай бэхлэгдэх, хоруу чанар бүхий омгуудад эзэн эсийг гэмтээх нь вакуолжуулах цитотоксин А (VacA) болон онкоген CagA уураг нөхцөлдүүлдэг.[5,6] Зарим CagA хувилбар нь эзэн эсийн сигнал дамжилтыг өөрчилснөөр ходоодны аденокарцинома үүсэх эрсдлийг нэмэгдүүлдэг.[7] CagA уураг нь С-төгсгөлийн дараалалд мембраны холбоо бүхий тирозины фосфоржуулах хэсэг болох EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) гэх амин хүчлийн өвөрмөц дараалал бүхий хэв шинжийг агуулдаг.[8] Ойролцоох пептидын дарааллаас хамаарч EPIYA-A, -B, -C, -D гэсэн 4 өөр төрлийн EPIYA бүс тодорхойлогддог.[9] АНУ, Европ болон Австрали улсаас илрүүлсэн омгууд ихэвчлэн EPIYA-A, -B, -C аллелийг агуулдаг бөгөөд барууны хэв шинж гэж нэрлэгддэг. Харин Япон, Өмнөд Солонгос, Хятад улсаас илэрсэн омог нь EPIYA-A, -B, -D аллелийг агуулсан байх ба Зүүн Азийн хэв шинж гэх болсон.[10]

Т.Цэрэнтогтох нарын судлаачид ходоодны үрэвсэл болон хавдартай өвчтнүүдэд хийсэн судалгаанд хеликобактерийн EPIYA хэв шинжийг тодорхойлсон бөгөөд барууны хэв шинж болох ABC хэв шинжүүд нь ходоодны үрэвсэлтэй (n=142/341) болон хавдартай (n=11/17) өвчтнүүдэд хамгийн элбэг илэрсэн болохыг тодорхойлсон байна.[11]

Бид ходоодны хавдрын өвчлөлгүй Монгол хүнээс хеликобактерийн омог ялгаж аван EPIYA хэв шинжийг тодорхойлох зорилгоор энэхүү судалгааг хийж гүйцэтгэлээ.

Зорилго: Монгол оронд тархсан хеликобактерийн хэв шинжийг тодорхойлох

Зорилт:

1. Хеликобактерийн тархалтыг тодорхойлох
2. Хеликобактерийн CagA хэв шинжийг тодорхойлох

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг нэг агшингийн судалгааны загварыг ашиглан 2018 оны 5 дугаар сараас 9 дүгээр сарын хооронд шинжлэгдэхүүнийг цуглуулсан бөгөөд АШУҮИС-ийн Эрхэс эмнэлэг болон УНТЭ-ийн дурангийн тасгаар үйлчлүүлсэн нийт 293 үйлчлүүлэгчдээс таниулсан зөвшөөрөл авсны үндсэн дээр хийж гүйцэтгэв. Судалгааг АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хороо болон Монгол улсын Эрүүл Мэндийн Яамны ёс зүйн хорооноос зөвшөөрөл авч гүйцэтгэсэн.

Шинжлэгдэхүүн цуглуулах ба хеликобактери өсгөвөрлөх: Ходоодны дурангийн шинжилгээний үед ходоод улаан хоолойн сөөргөө өвчнийг Лос Анжелесийн шалгууруар, ходоодны салстын өөрчлөлтийг Сиднейн системээр тус тус үнэлсэн. Ходоодны амсраас 3 см орчим зайд буюу антрум хэсгээс эдийн шинжилгээ авч, хеликобактери өсгөвөрлөх шинжилгээ хийсэн. Судалгаанд оролцогчдыг ходоодны үрэвсэл болон шарх гэсэн оношийн бүлгүүдэд дурангийн шинжилгээгээр Сиднейн системийн дагуу ангилав.

Ходоод дурандах үед авсан биопсийн эдийг 20% глицеролтой тархи-зүрхний хандтай (Biolab, Budapest, Hungary) 500 мкл шингэн тэжээлт орчинтой 1.5 мл ариун тюбэнд хийж шинжлэгдэхүүнийг 2 цагийн АШУҮИС-ийн бичил амь судлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхимийн лабораторид тээвэрлэн хүргэж, өсгөвөрлөх шинжилгээг хийсэн.

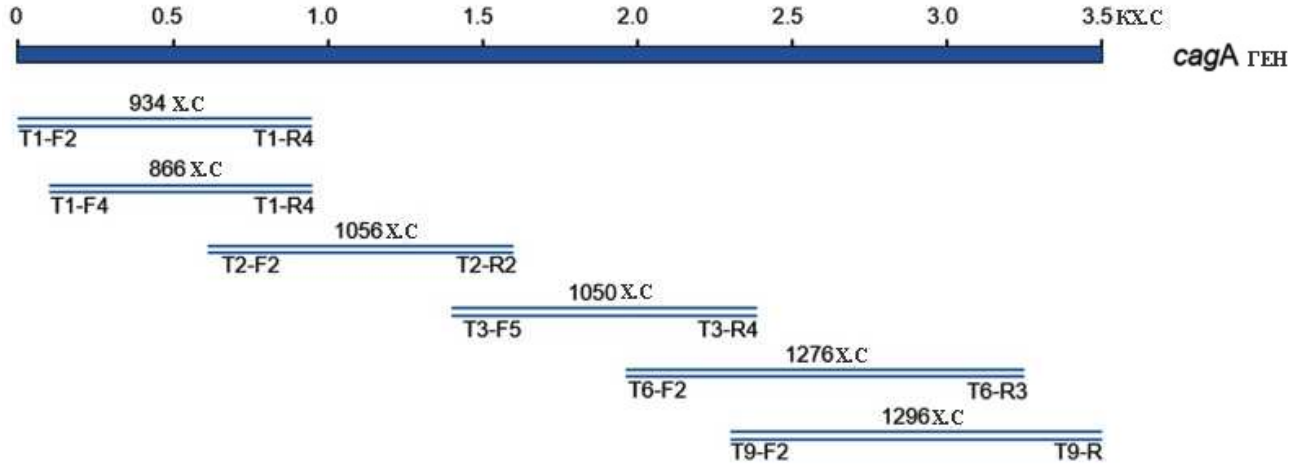
Эдийн шинжлэгдэхүүнийг зөөврийн тэжээлт орчинд 1-2 минутын турш 9000 эргэлт/мин хурдаар эд задлагч 23М багаж ашиглан нэгэн жигд болгосон. Булингаас 50 мкл хэмжээтэйг соруулан авч тархи-зүрхний ханд, амфотрецин Б (10 мг/л), колистин (5 мг/л), ванкомицин (15 мг/л), 2,3,5-трифенил тетразолийн хлорид (ТТС; 40 мг/л) болон 10% (v/v) адууны цустай тэжээлт орчинд (зурааслаж тарих аргаар) тарьж, микроаэрофиль орчинд (2-5% O_2, 5-10% CO_2) 37ºС хэмд 48-72 цагийн турш өсгөвөрлөв. Алтлаг өнгөтэй колони үүсгэн өсгөвөрлөгдсөн хеликобактерийг антиген илрүүлэх тест (Onsite H. pylori Ag rapid test, CTK biotech, San Diego, USA) болон уреазын сорилоор (Xilong Chemical, Shantou, China) баталгаажуулсан. Өсгөвөрлөгдсөн колонийг 10% адууны цусаар баяжуулсан тархи-зүрхний хандтай агарт дахин сэлгүүлэн өсгөвөрлөсний дараа хадгалах тэжээлт орчинд хийж -80ºС хэмд хадгалав.

ДНХ ялгах: Хеликобактерийн омгоос ДНХ ялгахдаа өсгөвөрлөгдсөн колонийг авч 1 мл фосфатын буфер уусмал болон ДНХ ялгах оношлуур ашиглан (Qiagen, Hilden Germany) үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу АШУҮИС-ийн бичил амь судлал, халдварын сэргийлэлт хяналтын тэнхимийн лабораторид хийж гүйцэтгэсэн. ДНХ бүхий уусмалыг ууршуулан хөлдөөсний дараа ХБНГУ-ын Дюсселдорфын Хейнрих-Хейнагийн Их сургуулийн Анагаахын микробиологи, Эрүүл ахуйн институт рүү илгээсэн ба 50 мкл нэрмэл усаар эргэн шингэлэн -20ºС хэмд ПГУ хийх хүртэл хадгалсан.

CagA гений праймерийн загвар: Өмнө нь хэвлэгдсэн *cagA* гений праймерийн дараалал болон Ген Банк дахь *cagA* гений дарааллын олон эгнээг ашиглан 60ºС хэмд халаан Lasergene Software Package-H PrimerSelect (Version 6.0, DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) ашиглан зорилтот байтай, *cagA* генийг бүхлээр нь илрүүлэх давтагдсан хэсэг бүхий хос праймерийг гаргаж авсан (Хүснэгт 1, Зураг 1).

Хүснэгт 1. *CagA* генийг илэрүүлэхэд ашигласан праймерийн загвар

Forward праймер (5'-3')	Reverse праймер (5'-3')	ПГУ-ийн бүтээгдэхүүний урт (х.с)
Tl-Fup (TTGCGGGTAAAAATGTGAATCG)	T1-R4 (GACYCCCCATTAGCAYAGA)	1135
T1-F2 (ATGACTAAYGAAACYATCGATCAAAC)	T1-R4	934
T1-F4 (GCAACGATTTATCAATAATCTTCAR)	T1-R4	866
T2-F2 (TGAAAGMAAGGCAAGAAGCAGA)	T2-R2 (TAGGCAAATTAAAGACAGC)	1056
T3-F5 (GAGTTTGGTAATGGGGAAGTG)	T3-R4 (TTCGGCTAGGGCTTGCTC)	1050
T6-F2 (AGGAGAGCTCGAGGCTAGTAAGGAA)	T6-R3 (CTTGAGCCACTCAGGGnTTTTT)	1276
T9-F2 (AACCTTAATGCAGCTTTGAAYG)	T9-R CTTAAGArTTYTGGAAACCAC)	1296



Зураг 1. *CagA* гений хэсгийг үзүүлсэн схем.

Гений бүтэн зураглалыг ПГУ-аар үүссэн бүтээгдэхүүний жижиг хэсэгтэй харгалзуулан үзүүлэв.

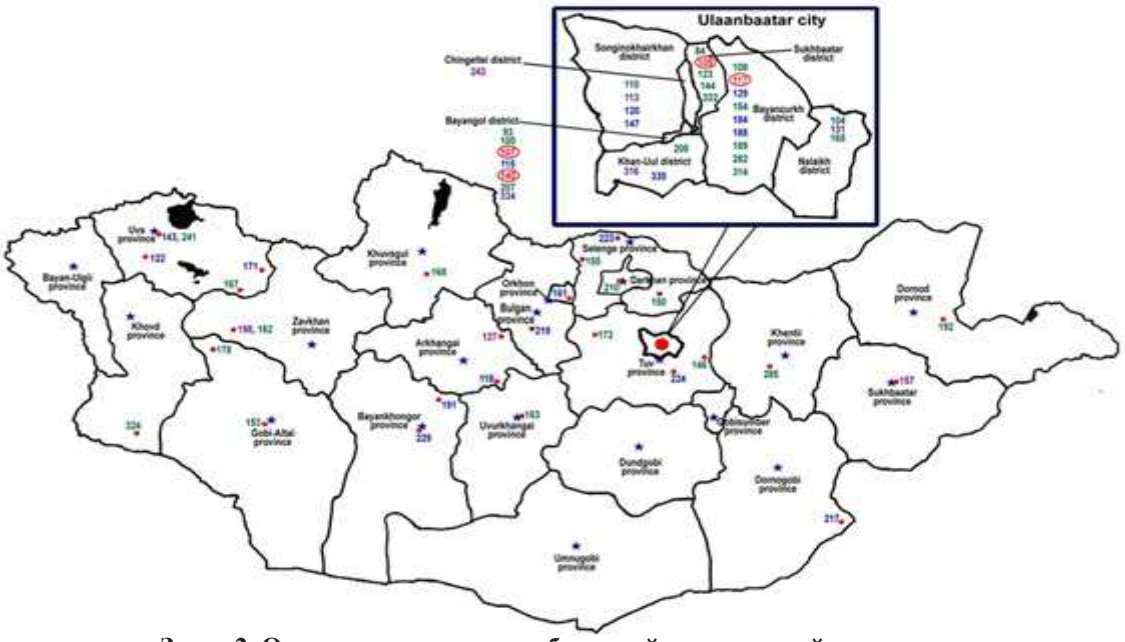
Нуклейн хүчлийн дараалал тогтоох Сангерын арга болон биоинформатикийн анализ: ПГУ-н бүтээгдэхүүний тус бүрийн праймерыг ашиглан Сангерын аргаар нуклеотидын дарааллыг тодорхойлж, LaserGene software package-н Seqman (Version 5.08, DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) программыг ашиглан давтагдсан дарааллыг нэгтгэн, ПГУ-ын бүтээгдэхүүнд анализ хийв. Ялгаж авсан CagA уургийн дарааллын BLASTP анализ хийн, холбогдох EPIYA төрлийг мэдээллийн сан дахь илүүдэл бус уургийн дараалалтай гомолог байдлыг тодорхойлсон. CagA уургийн дараалал болон MegAlign программын Clust-alW NetPhos3.0 үйлдлийг ашиглан тэдгээрийн EPIYA дарааллыг нэгтгэв.

Бид судалгааны ажлын тоон үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг Stata Release 15 (StataCorp, College Station, TX) программыг ашиглан хийж гүйцэтгэв. Судалгааны бүлэг хоорондын харьцуулалтыг хи-квадрат тест, Kruskal-Wallis тестийг ашиглан хийв.

Үр дүн: Судалгааны бүлгийн онцлог: Судалгаанд хамрагдсан нийт 293 хүний 86 хүнд хеликобактери өсгөвөрлөх шинжилгээ эерэг илэрсэн бөгөөд нийт шинжлэгдэхүүнээс 61/86-г сэлгүүлэн өсгөвөрлөж, ялган дүйлтийг хийв. Бүс нутгийн хувьд Улаанбаатар хотоос 32, хөдөө орон нутгаас 29 шинжлэгдэхүүнд өсгөвөр эерэг гарсан (Зураг 2). Судалгаанд оролцогчдын 1/3 нь эрэгтэйчүүд ба дундаж нас 47.13±10.07 жил байсан бол 2/3 –ийг эзэлж буй эмэгтэйчүүдийн дундаж нас 48.58±9.42 жил байв. Оролцогчдын дийлэнх хувь нь ходоодны үрэвсэлтэй (n=49/61, 80.33%), цөөн хувь нь ходоодны шархтай (n=12/61, 19.67%) байсан ба хүйсийн хувьд статистик ялгаа ажиглагдсангүй (p>0.05) (Хүснэгт 2).

Хүснэгт 2. Хеликобактерийн өсгөвөр эерэг илэрсэн оролцогчдын ерөнхий мэдээлэл

Оролцогч	Өсгөвөр эерэг	Дундаж нас	Ходоодны шарх	Ходоодны үрэвсэл
Эрэгтэй	37.70% (23/61)	47.13± 10.07	17.39% (4/23)	82.61% (19/23)
Эмэгтэй	62.30% (38/61)	48.58± 9.42	21.05% (8/38)	78.95% (30/38)
Нийт	100.00% (61/61)	48.03± 9.61	19.67% (12/61)	80.33% (49/61)



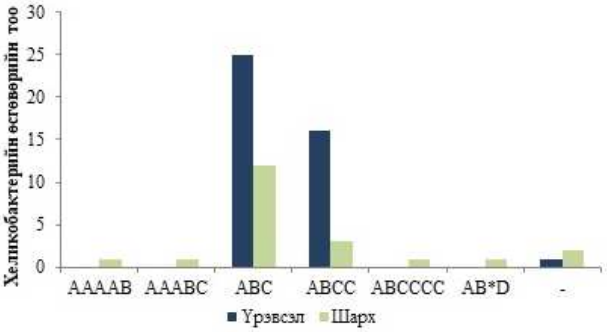
Зураг 2. Өсгөвөрлөгдсөн хеликобактерийн тархвар зүйн зураглал.

☆ Аймгийн төв

· Хеликобактери өсгөвөрлөгдсөн үйлчлүүлэгчийн байршлыг харуулав.

CagA EPIYA полиморфизм: Хеликобактерийн омгуудад *cagA* гений дарааллыг тодорхойлоход ПГУ-ийн давтагдсан хэсгүүдийн бүтээгдэхүүний урт 0.9-1.3 кх.н байлаа (Зураг 2). Шинжилгээнд бүгдэд нь сөрөг үр дүн үзүүлсэн 3 омог (127, 131 ба 334) байсан нь *cagA* ген байхгүйг илтгэж байв. Харин 11 омгийн (113, 120, 144, 146, 155, 198, 243, 282, 285, 314 ба 316) зарим шинжилгээнд сөрөг хариу гарсан нь праймер холбогдох хэсгийн хувилбар байх боломжтойг харуулсан ба нэг омог (157) устсан байв. *CagA* гений бүтэн дарааллыг тодорхойлоход нийт шинжлэгдэхүүний 75.41% (46/61), EPIYA хэсгийн 86.89% (53/61)-д нь амжилттай болов. Бүрэн тодорхойлсон *cagA* гений урт харилцан адилгүй буюу 1172 амин хүчлийн (АХ) урттай (105, 107 омог), 1226 АХ (117 болон 229 омог) байв. Давтагдсан дарааллыг ажиглахад 168 болон 241 дугаартай омог, 207 болон 210 дугаартай омгуудын *cagA* гений дараалал ижил болох нь тогтоогдсон (Зураг 1). Гэвч судалгааны уг 2 оролцогч өөр өөр аймагт амьдардаг тул энэ омгуудын төсөөт байдалыг бид урьдчилан таамаглах боломжгүй байв.

219 болон 229 омгууд, 150, 165 болон 172 омгууд EPIYA хэсгийн хувьд ижил байсан. Бидний судалгаанд хамрагдсан нийт омгийн зөвхөн 107 омог ABD зураглал бүхий EPIYA хэсэгтэй зүүн Азийн хэв шинжийн *cagA* ген агуулж байсан ба үлдсэн 52 омог нь барууны хэв шинжид хамрагдаж, үүнээс 59.6% (n=31/52) нь зөвхөн нэг EPIYA-C хэсэгтэй барууны CagA I хэв шинжийг, 38.5% (n=20/52) нь олон EPIYA-C хэсэгтэй барууны II хэв шинжийг тус тус агуулж байв. Барууны I хэв шинжийн *CagA* гений ихэнх нь (n=30/31) ABC зураглал бүхий EPIYA хэсэгтэй байсан бол II барууны хэв шинжийн *CagA* гений ихэнх (n=19/20) нь ABCC зураглал бүхий EPIYA хэсэгтэй тодорхойлогдсон. Судалгааны явцад ABCCCC, AAABC болон AAAAB гэсэн 3 ховор тохиолдох EPIYA зураглал бүртгэгдсэн. Ходоодны үрэвсэлтэй 49 өвчтний 25 (51.0%) нь ABC зураглал бүхий, 16 (32.7%) нь ABCC зураглал бүхий *cagA* гентэй байлаа. Ходоодны шархтай 12 өвчтний 5 (41.7%) нь ABC зураглалтай, үлдсэн 3 (25.0%) нь ABCC зураглатай байв (Зураг 3). EPIYA-A, EPIYA-C мотив болон оношийн бүлэг хооронд ач холбогдол бүхий хамаарал ажиглагдсангүй ($p>0.05$).



Зураг 3. Ходоодны үрэвсэлтэй болон шархтай оролцогчдоос өсгөвөрлөгдсөн хеликобактерийн хэв шинж (босоо баганаар өсгөврийн тоо, хэвтээ тэнхлэгээр илэрсэн хэв шинжийг харуулав).

EPIYA-A болон -C хэсгийн давтагдсан дарааллын ялгааг Chattopadhyay (2012)[12] нар илүү дэлгэрэнгүй тайлбарласан ба үүнд [EPIYA+V1] нь EPIYA-A хэсэгт, [I2+I3+EPIYA+W1] нь EPIYA-C хэсэгт олон давтагдсан байна. Бидний судалгаанд 117 омгийн 3 давтагдсан EPIYA-A хэсэг нь өөр хоорондоо ижилхэн ба 168, 241 омгуудын ABC зураглал бүхий EPIYA-A хэсэгтэй ижилхэн байлаа. 140 омгийн EPIYA-A хэсгийн давтамж нь 2 бүлэг (EPIYA-A 140-1 болон 140-2), (EPIYA-A 140-3 140-4) байдлаар илэрсэн. 140_1+2 омгийн EPIYA-A хэсгийн давтагдсан дараалал нь 110 омгийн ABC, 143, 147 болон 224 омгийн ABCC хэсэг, мөн 140_3+4 омгийн EPIYA-A хэсэг нь 192 болон 208 омгийн ABC хэсэгтэй адилхан байв. Монгол оронд тархсан хеликобактерийн CagA уургийн 60%-д

EPIY**A**-B мотив, EPIY**T**-B мотивоор солигдсон байв. EPIY**T**-B хэсэг нь CagA уургийн А-баялаг EPIYA зураглал (AAAAB ба AAABC), ABC зураглалтай уурагт илүү давамгай (77%; n=23/30), ABCC зураглалтай уурагт харьцангуй бага (37%; n=7/19) илэрсэн бол 105 (ABCCCC) болон 107 (ABD) омгуудад огт тодорхойлогдоогүй. EPIYA-C баялаг CagA уурагт EPIYA-B хэсгийн давамгайлал (≥2 EPIYA-C хуулбарт (n=13/20)) илэрсэн бөгөөд нөгөө талаас EPIY**T**-B CagA уураг нь EPIYA-C хэсгийн хомсдолтой (<2 EPIYA-C (n=25/32)) байсан нь барууны хэв шинжийн *CagA* гентэй статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай (p=0.015) байлаа. EPIYA мотивийн Y хэсгийн байрлалаас (+1) урдуур байрласан ((-6) байрлалаас (-4) хооронд)) амин хүчлийн (AX) гурвалууд нэг дор байрласан нь ажиглагдлаа. EPIYA-A1 хэсгийн өмнөх байрлалд ихэвчлэн LKN, LEN ба NST гурвал ажиглагдсан ба EPIYA хэсгийн A1 хэв шинжээс бусад хэсгийн өмнөх байрлалд огт ажиглагдаагүй байна (Хүснэгт 3).

EPIYA-A мотивийн олон давтагдсан A2, A3 болон A4 мотивийн өмнөх байрлалд NPE, NLE мөн SPE зэрэг аминхүчлийн гурвал илэрсэн. EPIYA-B хэв шинжийн өмнөх байрлалд NPE, NLE, SPE, SHE болон SLE гурвал ажиглагдав. EPIYA-C мотивийн өмнөх байрлалд ASP, ANH болон ANP гурвал ихэвчлэн тодорхойлогдсон. EPIYA хэсгийн A2, A3 болон A4 хэв шинж нь EPIYA-B хэв шинжтэй нэг дор байрласныг аминхүчлийн гурвалуудаар тодорхойлов. B-кластерийн аминхүчлийн гурвалын (A2, A3, A4 эсвэл дурын B мотив) онцлог шинж нь -4 байрлал дахь E аминхүчил юм. B-кластерын гаднах EPIYA мотивийн -4 байрлалд E аминхүчил огт илрээгүй. Эдгээр амин хүчлийн дараалал нь cagA уургийн фосфоржилтыг харуулахаас гадна хоруу чанарыг тодорхойлдог байна.

Хүснэгт 3.EPIYA мотивийн аминхүчлийн гурвал

EPIYA мотив код	Нийт	A кластер			B кластер					C кластер		
		LKN	LEN	NST	NPE	NLE	SPE	SHE	SLE	ASP	ANH	ANP
A1	53	36	15	2	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A3	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B1(EPIYA)	20	0	0	0	1	0	18	1	0	0	0	0
B2 (EPIYT)	32	0	0	0	3	3	17	0	9	0	0	0
B3 (EPIYA)D	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CI	51	0	0	0	0	0	0	0	0	28	22	1
C2	20	0	0	0	0	0	0	0	0	11	9	0
C3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
C4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Хэлцэмж: Хеликобактерийн хоруу чанарын хүчин зүйл нь CagA болон EPIYA полиморфизмтэй нягт уялдаа холбоотой. Зүүн Азийн CagA (ABD) хэв шинж нь барууны (ABC) хэв шинжийг бодвол илүү хоруу чанартай, хорт хавдар үүсэлттэй холбоотой байдаг нь тогтоогдсон.[13] Олон давтагдсан EPIYA-C мотив бүхий барууны CagA II хэв шинжийн хеликобактерийн омог нь барууны CagA I омогтой харьцуулахад илүү хоруу чанартай ба хүнд хэлбэрийн шарх болон ходоодны хавдартай холбоотой байв.[14,15] Грек улсын насанд хүрэгчдийн дунд нэгээс илүү EPIYA-C мотивтой CagA уургийн илрүүлэг хийхэд насанд хүрсний дараа EPIYA-C мотив олширох нь хоруу чанарын хүчин зүйлс нэмэгдэхтэй холбоотой үр дүн гарсан байна.[16]

2017 оны мета-судалгааны дүнгээр барууны хэв шинжийн CagA-хамааралт өвчлөл нь үндэстэн хооронд ялгаатай олон EPIYA-C мотивтой CagA нь Азид ходоод, нарийн гэдэсний шарх үүсгэдэг бол Европ болон АНУ-д ходоодны хавдар үүсэх нь илүү гэжээ.[17] Манай улс ходоодны хавдрын шалтгаант нас баралтын тоогоор дэлхийд тэргүүлдэг ба ходоодны архаг үрэвсэл, шарх болон ходоодны хавдартай өвчтнүүдийн шинжлэгдэхүүнд хоруу чанар багатай барууны хэв шинжийн CagA бүхий хеликобактерийн омог давамгайлж байсан нь судлаачдын анхаарлыг татаж байна.[11] Хеликобактерийн CagA эерэг байх нь ходоодны хавдар үүсгэх хангалттай эрсдэл болохгүй харин бусад хүчин зүйл хавдрын эмгэг жамд илүү нөлөөлдөг гэсэн таамаглалууд байдаг. Хеликобактерийн бусад хоруу чанарын хүчин зүйлс (Ж/нь: VacA, BabA болон адгезин уураг) болон ходоодны хэвийн бичил биетний хоорондын синергистик/антагонистик нөлөө, удамшил болон бусад халдварт өвчнүүд (Ж/нь: EBV) зэрэг нь ходоодны хавдрын эмгэг жамд нөлөөлдөг эсэх нь судлагдсаар байна.[18-20]

Б.Гантуяа (2020) нарын судалгаагаар хеликобактерийн халдвараас үл хамааран өдөр бүр давстай цай тогтмол уух (p=0.0001), тамхи татах (p=0.002), хэт халуун зүйлс уух (p=0.001) болон жимс бага идэх (p=0.005) зэрэг нь ходоодны шархтай өвтнүүдэд хяналтын бүлэг буюу хавдаргүй өвтнүүдтэй харьцуулахад илүү их байв.[18] Бидний судалгааны хавдрын бус бүлэгт зүүн Азийн (ABD) хэв шинжтэй нэг омог илэрсэн ба бусад омгууд нь бүгд барууны хэв шинжид хамаарч байсан. Барууны CagA I хэв шинж (n=31/52), барууны CagA II хэв шинжээс (n=20/52) давамгай илэрсэн нь Монголын бусад судлаачдын болон барууны орны судлаачдын үр дүнтэй дүйж

байгаа бөгөөд дээрх орнуудад хоруу чанар багатай омгийн тархалт буйг илтгэж байна.[11,15,21-23] Түүнчлэн Т.Цэрэнтогтох (2019) нарын судлаачдын тогтоосон болон манай судалгаанд олон давтагдсан EPIYA-C мотив нь өвчний хоруу явцтай статистик ач холбогдол бүхий хамараалтай тодорхойлогдоогүй нь судалгааны түүврийн тоо бага эсвэл оношийн шалтгаантай байж болох юм. Т.Цэрэнтогтох (2019) нарын судалгаанд дурангийн шинжилгээний оношийг гистологийн шинжилгээгээр баталсан бол бидний судалгаанд зөвхөн дурангийн оношийг ашигласан. Дурангийн эмчийн ур чадвараас онош хамааралтай тул энэ нь манай судалгааны хязгаарлагдмал тал болж байна.[11,24]

EPIYA-A хэсэг олон давтагдсан байх нь харьцангуй ховор бөгөөд өмнөх ажлуудад дурьдагдаагүй 2 шинэ EPIYA-A баялаг CagA уураг бидний судалгаагаар тодорхойлогдсон нь эдгээрийн эмгэг жамын талаар судлах шаардлага байгааг харуулж байна. Хэдийгээр хэд хэдэн өгүүлэлд давтагдсан EPIYA-A хэсэгтэй CagA уургийн дараалал (Ж/нь: AABC[25], AABCC[23], AABD[26]) дурдагдсан ч одоогоор CagA уургийн ганцхан дараалал Genbank-нд бүртгэгдсэн (AAABCC, C142/LD; Acc.-no. ABS11158) ба уг уураг нь давтагдсан 3 EPIYA-A, мөн 2 EPIYA-C мотивоос тогтсон байна.

EPIYA мотивийн хажуугийн бүсийн фосфоржилтын эмгэг жамд үзүүлэх нөлөөг аминхүчлийн уруу урсгалын зарчим аль хэдийн судлагдсан бол EPIYA хэсгийн өмнө байрласан аминхүчлийг манай судалгаанд анх удаа судалсан.[27] Монгол оронд тархсан хеликобактерийн cagA уургийн өмнөх аминхүчлийн гурвалууд нь өмнөх судлаачдынхтай ижил буюу нэг EPIYA-A мотивийн урд LKN(ST), EPIYA-B мотивийн өмнө STE, EPIYA-C болон -D-мотивийн өмнө VSP, ASP тус тус байрласан байв.[27] Өмнө нь байралсан глутамат (E)-г -4 байрлалд агуулж буй B-кластерийн AA гурвал нь олон давтагдсан EPIYA-A (A2, A3 ба A4) мотивийн дарааллын мэдээлэл өмнөх судлаачдын үр дүнтэйдүйж байна.[28-29] Энэхүү глутамат нь зарим (арилжааны) фосфотирозины эсрэг бие холбогдоход саад болох EPIYA-A бүсэд бүтцийн өөрчлөлтийг үүсгэдэг гэх таамаглал бий бөгөөд фосфоржилтыг судлахдаа анхаарах ёстой юм.[30]

Хеликобактерийн халдвартай өвчтөнүүдийн ийлдэс нь EPIYA-A мотив, EPIYA-B мотив, мөн гурав дахь EPIYA-A мотивийн зэрэгцээ SPE-ээр дээшээ, QVNK-ээр доошоо зохицуулгатай (химер) пептидийг бүрхсэн гурван пептидэд хүчтэй хариу үйлдэл үзүүлж байсан нь энэхүү судалгааны A2, A3, A4 олон давтагдсан EPIYA-A мотивийн дарааллалтай харгалзах боломжтой[31]. Нэг талаас пептидийн тирозины фосфоржих идэвхи ихэнх хүний ийлдэст буурсан нь, нөгөө талаас бидний үр дүнгээр EPIYA-A мотивийн A2, A3 ба A4 хэсгийн өндөр фосфоржих таамаглал нь EPIYA-A мотивийн A2, A3 ба A4 хэсгийн дархлаа өдөөх чадвар суларсаныг илтгэх боломжтой. EPIYA-B мотивтой харьцуулахад EPIYT-B мотивийн таамагласан фосфоржилтын түвшин бага байгаа нь EPIYT-B мотивийн дархлаа өдөөх чадвар өндөр байгааг илтгэх магадлалтай юм.

Дүгнэлт: Монгол оронд тархсан хеликобактерийн омог нь барууны хэв шинжийн CagA давамгайлж байгаа бөгөөд хамгийн түгээмэл тохиолдох ABC болон ABCC дэд төрлүүдээс гадна EPIYA-A баялаг AAABC болон AAAAB хоёр дэд хэв шинжийг анх удаа илрүүлсэн ба эдгээр хэв шинжийг халдварын эмгэг жамд бага нөлөөтэй гэж үздэг боловч цаашид in-vivo судалгаагаар уургийн түвшинд баталгаажуулах шаардлагатай байна.

Ном зүй:

1. *Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., 2017. Global prevalence of Helicobacter pylori infection: systematic review and metaanalysis. Gastroenterology 153 (2), 420–429.*
2. *Warren, J.R., Marshall, B., 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1 (8336), 1273–1275.*
3. *Blaser, M.J., 1998. Helicobacter pylori and gastric diseases. BMJ (Clin. Res. Ed.) 316 (7143), 1507–1510.*
4. *Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J., 1997. Helicobacter pylori. Clin. Microbiol. Rev. 10 (4), 720–741.*
5. *Kao, C.Y., Sheu, B.S., Wu, J.J., 2016. Helicobacter pylori infection: an overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed. J. 39 (1), 14–23.*
6. *Nejati, S., Karkhah, A., Darvish, H., Validi, M., Ebrahimpour, S., Nouri, H.R., 2018. Influence of Helicobacter pylori virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. Microbial Pathog. 117, 43–48.*
7. *Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., et al., 1995. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 55 (10), 2111–2115.*
8. *Hatakeyama, M., Higashi, H., 2005. Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci. 96 (12), 835–843.*
9. *Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. Science 295 (5555), 683–686.*
10. *Yamaoka, Y., Osato, M.S., Sepulveda, A.R., Gutierrez, O., Figura, N., Kim, J.G., et al., 2000. Molecular epidemiology of Helicobacter pylori: separation of H. pylori from East Asian and non-Asian countries. Epidemiol. Infect. 124 (1), 91–96.*
11. *Tserentogtokh, T., Gantuya, B., Subsomwong, P., Oyuntsetseg, K., Bolor, D., ErdeneOchir, Y., 2019. Western-type Helicobacter pylori CagA are the most frequent type in mongolian patients. Cancers 11 (5).*
12. *Chattopadhyay, S., Patra, R., Chatterjee, R., De, R., Alam, J., Ramamurthy, T., 2012. Distinct repeat motifs at the C-terminal region of CagA of Helicobacter pylori strains isolated from diseased patients and asymptomatic individuals in West Bengal, India. Gut Pathog. 4 (1), 4.*
13. *Yuan, X.Y., Yan, J.J., Yang, Y.C., Wu, C.M., Hu, Y., Geng, J.L., 2017. Helicobacter pylori with East Asian-type cagPAI genes is more virulent than strains with Western-type in some cagPAI genes. Braz. J. Microbiol.: [Publ. Braz. Soc. Microbiol.] 48 (2), 218–224.*
14. *Sicinschi, L.A., Correa, P., Peek, R.M., Camargo, M.C., Piazuelo, M.B., Romero-Gallo, J., et al., 2010. CagA C-terminal variations in Helicobacter pylori strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. Clin. Microbiol. Inf.: Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16 (4), 369–378.*
15. *Beltran-Anaya, ´ F.O., Poblete, T.M., Rom´ an-Roman, ´ A., Reyes, S., de Sampedro, J., Peralta-Zaragoza, O., et al., 2014. The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of Helicobacter pylori is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. BMC Gastroenterol. 14, 223.*
16. *Panayotopoulou, E.G., Sgouras, D.N., Papadakos, K., Kalliaropoulos, A., Papatheodoridis, G., Mentis, A.F., et al., 2007.*

Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in Helicobacter pylori clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 45 (2), 488–495.

17. *Li, Q., Liu, J., Gong, Y., Yuan, Y., 2017. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: a meta-analysis. Medicine 96 (17), e6620.*
18. *Gantuya, B., El Serag, H.B., Matsumoto, T., Ajami, N.J., Uchida, T., Oyuntsetseg, K., 2020. Gastric mucosal microbiota in a Mongolian population with gastric cancer and precursor conditions. Aliment. Pharmacol. Therap. 51 (8), 770–780.*
19. *Venerito, M., Vasapolli, R., Rokkas, T., Malfertheiner, P., 2018. Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy. Helicobacter 23 (Suppl. 1), e12518.*
20. *Boubrik, F., Belmouden, A., Kadmiri, N.E.L., 2021. Potential non-invasive biomarkers of Helicobacter pylori-associated gastric cancer. J. Gastrointest. Cancer.*
21. *Takahashi-Kanemitsu, A., Knight, C.T., Hatakeyama, M., 2020. Molecular anatomy and pathogenic actions of Helicobacter pylori CagA that underpin gastric carcinogenesis. Cell. Mol. Immunol. 17 (1), 50–63.*
22. *Kocazeybek, B.S., Caliskan, R., Erdamar Cetin, S., Ergin, S., Kuskucu, M., Kepil, N., 2015. Patterns of EPIYA motifs among cagA-positive Helicobacter pylori strains: a casecontrol study in a Turkish population with Eurasian geographical features. J. Med. Microbiol. 64 (10), 1117–1123.*
23. *Acosta, N., Quiroga, A., Delgado, P., Bravo, M.M., Jaramillo, C., 2010. Helicobacter pylori CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis. World J. Gastroenterol. 16 (31), 3936–3943.*
24. *Okamura, T., Iwaya, Y., Kitahara, K., Suga, T., Tanaka, E., 2018. Accuracy of endoscopic diagnosis for mild atrophic gastritis infected with Helicobacter pylori. Clin. Endosc. 51 (4), 362–367.*
25. *Breurec, S., Michel, R., Seck, A., Brisse, S., Come, ˆ D., Dieye, F.B., et al., 2012. Clinical relevance of cagA and vacA gene polymorphisms in Helicobacter pylori isolates from Senegalese patients. Clin. Microbiol. Infect.: Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18 (2), 153–159.*
26. *Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S., et al., 2006. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of Helicobacter pylori CagA. Gastroenterology 130 (4), 1181–1190.*
27. *Xia, Y., Yamaoka, Y., Zhu, Q., Matha, I., Gao, X., 2009. A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of Helicobacter pylori. PLoS One 4 (11), e7736.*
28. *Reyes-Leon, A., Atherton, J.C., Argent, R.H., Puente, J.L., Torres, J., 2007. Heterogeneity in the activity of Mexican Helicobacter pylori strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the cagA gene. Infect. Immun. 75 (7), 3445–3454.*
29. *Lind, J., Backert, S., Pfleiderer, K., Berg, D.E., Yamaoka, Y., Sticht, H., 2014. Systematic analysis of phosphotyrosine antibodies recognizing single phosphorylated EPIYAmotifs in CagA of Western-type Helicobacter pylori strains. PLoS One 9 (5), e96488.*
30. *Ansari, S., Akada, J., Matsuo, Y., Shiota, S., Kudo, Y., Okimoto, T., et al., 2019. Epitope peptides of Helicobacter pylori CagA antibodies from sera by whole-peptide mapping. J. Gastroenterol. 54 (12), 1039–1051.*

Characterization of *Helicobacter pylori* in Mongolia

Oyunbaatar A[1], Battogtokh Ch[1], Enkhgerel N[1], Birgit Henrich[3], Avarzed A[4]

[1]Department of Microbiology and Infection Prevention Control, School of Bio-Medicine, MNUMS
[2]Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany
[3]Department of International Cyber Education, Graduate School, MNUMS
E-mail: Oyunbaatar@mnums.edu.mn, Tel: +976-99103441

Background: *Helicobacter pylori* infection is strongly associated with gastritis, gastroduodenal ulcer disease and gastric carcinoma. The virulence of *H. pylori* strains increases with the presence of the pathogenicity island PAI, which encodes a Type 4 Secretion System and the oncoprotein CagA. Two major CagA types can be distinguished by differences in the repetitive EPIYA region in the C-terminal sequence; the more virulent East Asian CagA type with EPIYA-A, -B, and -D motifs and the Western CagA type with EPIYA-A, -B, and C motifs, the virulence of which is associated with the multitude of EPIYA-C motifs.

Aim: To determine the predominant types and epidemiology of Helicobacter pylori strain EPIYA isolated from patients without gastric cancer living in 18 provinces of Mongolia.

Materials and Methods: The biopsies taken during the gastroscopy of the study participants were dissected and cultured in a selective medium for the Helicobacter pylori culturing, and PCR analysis was performed to detect the CagA gene by extracting DNA from the culture according to the DNA isolation protocol. The PCR products were subjected to sequencing and the EPIYA motif of the CagA gene was identified.

Results: In this study, the cagA gene was characterized in *H. pylori* strains isolated from Mongolians suffering from gastritis (80%) or ulcer (20%). The EPIYA region of 53 isolates was determined by PCR-amplification of overlapping cagA regions and subsequent Sanger sequencing. Only one H. pylori isolate carried the East Asian type (ABD) and 52 isolates the Western type of CagA, thereof 30 the EPIYA type ABC, 19 the ABCC type and one each of type ABCCCC, AAABC and AAAAB. An amino acid exchange from EPIYA-B to EPIYT-B was predominantly found in CagA proteins in strains with < 2 EPIYA-C copies (n=25/32; p=0.015) including the two EPIYA-A enriched CagA proteins, which have not been described to date. Due to the amino acid triplet preceding the EPIYA motif and strength of predicted phosphorylation, the multiple EPIYA-A motifs A2, A3 and A4 were shown to cluster with EPIYA-B and EPIYT-B with the unique feature of amino acid E in position − 4 to Y of EPIYA.

Conclusion: Helicobacter pylori strains distributed in Mongolia are dominated by Western type CagA and the most common subtypes are ABC and ABCC. In our study, two EPIYA-A-rich subtypes AAABC and AAAAB were identified for the first time, and these subtypes are considered to be less virulence, but further *in-vivo* studies are necessary at the protein level.

Keywords: CagA protein, EPIYA motif, Western type