Ходоодны архаг үрэвсэл ба ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлтийн үеийн *HELICOBACTER PYLORI* халдвар ба микробиомын асуудалд

Н.Оюунбилэг[1], Н.Бира[1,2], Х.Оюунцэцэг[3], Д.Даваадорж[1-3], С.Бадамжав[1,2], Н.Баярмаа[1,2], А.Энх-Амар[1-3], О.Баярсайхан[1-3], М.Бадрах[1-3], Б.Гантуяа[1-3]

[1]АШУҮИС, Хоол боловсруулах эрхтэн судлалын тэнхим
[2]АШУҮИС,Монгол-Японы эмнэлэг, Дотрын тасаг
[3]АШУҮИС,Монгол-Японы эмнэлэг, Дурангийн тасаг
Цахим хаяг: gantuya@mnums.edu.mn, Утас: 94088505

Түлхүүр үг:

Ходоодны архаг үрэвсэл
Ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлт
Helicobacter pylori
Ходоодны микробиом
16S рРНХ ампликон секвенс

Товч утга:

Үндэслэл: 16S рибосомын рибонуклейн хүчлийн (рРНХ) ампликон секвенсийн арга нь өсгөврийн арга ашиглалгүйгээр бактерийн халдварыг нарийвчлан тодорхойлох сүүлийн үед шинжлэх ухаанд нэвтэрсэн арга юм[1]. Ходоодны өвчлөлийн үед *Helicobacter pylori (H. pylori)* халдвар нь ходоодны бусад микробиомтой хэрхэн хамааралтай оршдог эсэх нь одоогоор тодорхойгүй байна. **Судалгааны арга зүй:** Бид судалгаандаа 18 наснаас дээш, ходоодны биж шинжтэй судалгаанд оролцохыг зөвшөөрсөн Монгол улсын иргэнийг хамруулсан. Оролцогчдын ходоодны эдийн сорьц дээр шинэчилсэн Сиднейн ангиллын дагуу эдийн шинжилгээнд үнэлгээ хийж, 16S рРНХ дарааллыг тогтоосон. 16S рРНХ ампликон секвенсийн аргаар ходоодны микробиомийн байдлыг судалсан. **Үр дүн:** Нийт судалгаанд хамрагдсан 161 хүний дундаж нас нь 43.6, нийт хамрагсдын 64.6% нь эмэгтэйчүүд байв. *H. pylori* нь ходоодны микробиом дахь хамгийн давамгайлагч төрөл зүйл байлаа. Ходоодны нийт микробиомын төрөл зүйлүүд гэдэсний метаплазийн хувиралтай бүлэгт хамгийн их байна. **Дүгнэлт:** Бид энэхүү судалгаагаараа 16S rRNA ампликон секвенсийн аргыг ашиглан Монгол хүний ходоодны үрэвслийн үеийн *H. pylori*-ийн бодит тоон хэмжээ болоод бусад микробиомтой хэрхэн хамааралтай оршиж байгаа байдлыг харууллаа. Ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлт болох гэдэсний метаплазийн үед өвөрмөцөөр ихсэж байгаа кандидат микробиомийн төрөл зүйлийг тогтоолоо.

Үндэслэл: 2021 оны дэлхий дахинд бүртгэгдсэн хавдрын өвчлөлийн тоо баримтаас үзэхэд Монгол улс ходоодны хорт хавдрын тохиолдол ба нас баралтаар дэлхийд тэргүүлж байна[2]. Мөн ходоод, дээд гэдэсний шархлааны өвчлөл, нас баралтаар өндөр тархалт бүхий бүс нутагт орж байна[3]. 2019 оны Монгол улсын үндэсний статистикийн хорооны мэдээлснээр Хүн амын өвчлөлийн халдварт бус өвчлөлийн хоёрдугаар шалтгаан болсон хоол боловсруулах тогтолцооны өвчин сүүлийн 10 жилийн дунджаар нийт өвчлөлийн 15.5 хувь байсан ба бүтцийн хувьд улаан хоолой, ходоод, дээд гэдэсний өвчин 16.0 хувийг эзэлж байна[4]. Эдгээр өвчлөлийн дийлэнх шалтгааныг *H.pylori*-ийн халдвартай холбон тайлбарладаг. Монгол улсад 2018 оны байдлаар *H. pylori*-ийн халдвар 70%-ын тархалттай байна[5]. Харин ходоодны архаг үрэвслийн 20% орчим хувь нь *H. pylori*-ийн бус шалтгаантай байдаг[6] ба олон улсын Киотогийн ангилалд H*elicobacter heilmanni, Enterococcus, Micobacterium* ба *Syphillis* зэрэг нь ходоодны үрэвслийг үүсгэдэг болох нь тогтоогдсон байдаг[7]. Манай улсад 2020 онд хийгдсэн Б.Гантуяа судлаач нарын ходоодны хорт хавдрын үеийн микробиомын

судалгаагаар *Enterococci, Lactobacilli, Glutamicibacter, Paeniglutamicibacter, Escherichia coli* and *Carniobacterium* зэрэг бактерийн төрлүүд хавдрын хамааралтай болох нь тогтоогдсон[8]. Гэвч ходоодны хавдрын урьдал эмгэг болсон ходоодны хатингаршилт үрэвсэл, гэдэсний хучуур эдийн солигдлын үеийн ходоодны микробиомын өөрчлөлтийн судалгаа хомс байна.

Зорилго: Ходоодны архаг үрэвсэл ба ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлтийн үеийн ходоодны микробиомыг судлах

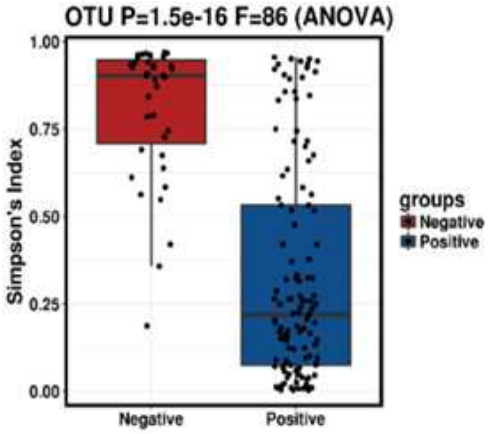
Зорилт: Ходоодны биж шинж илэрсэн үйлчлүүлэгчдийн ходоодны салстын макро, микро өөрчлөлтийг судлах,ходоодны архаг үрэвсэл, ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлтийн үеийн ходоодны микробиомийг 16S рРНХ ампликон секвенсийн аргаар шинжлэх, ходоодны микробиомын биостатистикийн боловсруулалт хийх.

Судалгааны арга аргачлал: Бид энэхүү судалгааг хийхдээ эмнэлэгт суурилсан нэг агшингийн судалгааны аналитик аргаар хийж гүйцэтгэсэн. Судалгаанд хамрагсдыг Монгол Улсын газар зүйн ялгаатай бүс нутгуудаас хамруулсан. Судалгаанд хамрагдагсдад улаан хоолой ходоодны уян дурангийн шинжилгээ хийж, гистологийн үнэлгээ хийхээр ходоодны салстаас 3 эд авсан[9]. Нэмэлтээр *H. pylori*-ийн өсгөврийн шинжилгээ, Түргэвчилсэн уреазийн сорил, Микробиомын секвенсийн шинжилгээнд зориулан дахин 3 эд авсан. Бид гистологийн үнэлгээг шинэчлэгдсэн Сиднейн ангиллаар үнэлсэн[10].

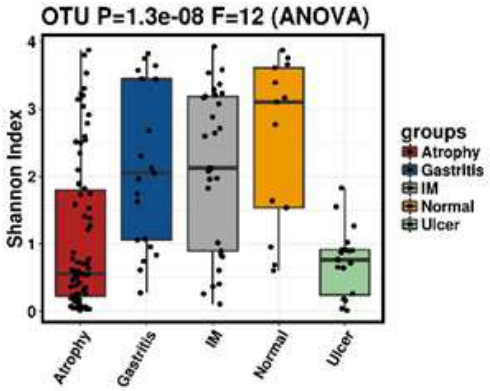
H.pylori-ийн халдварыг оношлохдоо гистологи/иммуногистохимийн арга, өсгөвөр, түргэвчилсэн уреазийн сорил ба серологийн шинжилгээнд эерэг гарсан тохиолдол бүрийг *H. pylori*-ийн халдвар эерэг хэмээн үзэж харин эдгээр шинжилгээнд бүгдэнд нь сөрөг гарсан тохиолдлыг сөрөг гэж үнэлсэн. Ходоодны салст бүрхүүлийн эдийн сорьцын ДНХ-г DNeasy Blood & Tissue Kit QIAGEN, Hilden, Germany цомог ашиглан гаргаж авч,16S rRNA генийг V3-V4 хэсгийн праймеруудыг ашиглан олшруулж, ДНХ-н дараалыг тогтоосон. 16S рРНХ-ийн дараалыг Calypso программ хангамж ашиглан анализ хийсэн (хувилбар 8.72). Статистик боловсруулалтыг SPSS 25.0 (SPSS Inc., Чикаго, АНУ, АНУ) ба R программ хангамжийн v.3.5.3 (R development Core team, R foundation for Statistical Computing, Вена, Австри) ашиглан хийсэн болно.

Үр дүн: Судалгаанд хамрагсдын дундаж нас 43.6±15.8 байсан ба 64.6% нь эмэгтэй байсан. *H. pylori*-ийн халдварыг тодорхойлоход 122 хүн *H. pylori* эерэг, 39 хүн *H. pylori* сөрөг байсан. Ходоод дээд гэдэсний уян дурангийн шинжилгээгээр 8.1% нь өөрчлөлтгүй, 48.4%-д хатингаршилт үрэвсэл, 13.1%-д ходоодны архаг үрэвсэл, 18%-д гэдэсний метаплази, 12.4%-д ходоод дээд гэдэсний шархлаа; гистологийн үнэлгээгээр үйлчлүүлэгчдийн 8.1% -д ходоодны салстын эмгэг өөрчлөлтгүй, 18%-д ходоодны архаг үрэвсэл, 54%-д хатингаршилт өөрчлөлт, 19.9%-д гэдэсний метаплазийн өөрчлөлт тус тус илэрсэн. Судалгаанд оролцогчдын ходоодны дээж дээр 16S ампликон секвенсийн аргаар бактерийн 126 төрөл зүйлийн Operational Taxonomic Units (OTUs) тодорхойлогдсон. Ходоодны өвчлөлийн байдлаар авч үзэхэд *H. pylori*-ийн OTU-ийн тоо хэмжээ нь ходоодны хатингаршилт өөрчлөлтийн (75664±57999) ба Ходоод дээд гэдэсний шархлааны үед (94505±36267) үед хамгийн өндөр, ($p<0.01$) хэвийн салсттай бүлэгт (10823±36215) хамгийн бага байлаа ($p<0.001$). Ходоодны эмгэгийн үед харьцангуй хувийн үзүүлэлт болох relative abundance (RA)-аар төрөл зүйлүүдийн дунд *H. pylori* нь ноёлогч бактер болох нь тогтоогдсон. *H. pylori*-ийн RA-ийн харьцангуй тоо хэмжээ нь ходоод, дээд гэдэсний шархлааны үед 87.7±9. байсан бол хэвийн салсттай бүлэгт (9.7±24.2%) хамгийн бага байна. *H. pylori*-ийн халдвар эерэг байгаа бүлэгт *H. pylori*-ийн халдвар сөрөг байгаа бүлгээс ходоодны микробиомын төрөл зүйлийн хэмжээ бага байна. (Зураг 1.)

Ходоодны хатингаршилт үрэвсэл ба ходоод, дээд гэдэсний шархлаа өвчний үед ходоодны микробиомын баялаг байдал хамгийн бага байгаа нь, ходоодны салстын өөрчлөлтгүй үед микробиомын баялаг байдал хамгийн их байгаа нь ажиглагдсан. (Зураг 2.)



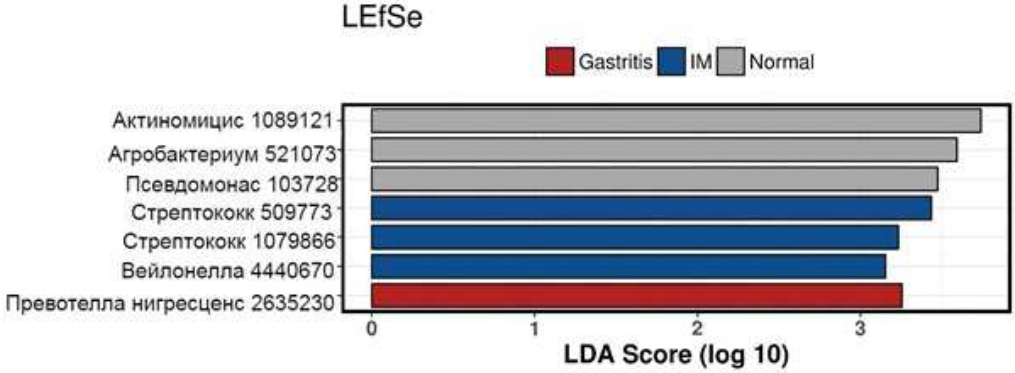
Зураг 1. Хеликобактер пилорийн халдвартай ба халдваргүй үеийн α diversity-ийн ялгааг Simpson's index-ээр харуулав.



Зураг 2. Ходоодны архаг үрэвсэл ба ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлтийн үеийн α diversity-ийн ялгаа Shannon's index-ээр харуулав.

Ходоодны салстын өөрчлөлтгүй үед *Actinomycosis, Agrobacterium, Pseudomonas* зэрэг нь өвөрмөцөөр оршин буй байсан бол гэдэсний хучуур

эсийн солигдолын үед *Streptococcus, Veylonella,* ходоодны архаг үрэвслийн үед *Prevotella nigrescens* нь өвөрмөцөөр тодорхойлогдож байлаа. (Зураг 3)



Зураг 3. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) анализаар ходоодны эмгэг тус бүрийн ач холбогдол бүхий кандидат нянгуудыг хааруулав

Хэлцэмж: Бид энэхүү судалгаагаар ходоодны хавдрын урьдал өөрчлөлтийн үеийн ходоодны микробиомын өөрчлөлт ба *H. pylori*-ийн тоон өөрчлөлтийг судлан тогтоолоо. Манай улсад хийгдсэн өмнөх судалгаагаар *Streptococcus and Hemophilus* нь *H. pylori*-ийн бус гастритийн үед илэрч байсан[11]. Бусад судлаачдын судалгаагаар ходоодны хатингаршилт өөрчлөлтийн үед *H. pylori*-ийн колонизаци буурч бусад нянгийн олшрол үүсч буйг тогтоосон байдаг боловч тухайлсан нянгийн тоон үзүүлэлт, өвчлөлийн үеийн ходоодны микробиомын харилцан хамаарлын талаарх мэдээ баримт хомс байна[12-14]. Энэхүү судалгаагаар ходоодны хатингаршил ба гэдэсний метаплазийн үед *Streptococcus, Enterococcus, Fusobacterium* зэрэг нь давамгайлан оршдогийг тогтоолоо. Эдгээрээс *Enterococcus* ба *Fusobacterium* нь ходоодны хавдрын тохиолдолд ихсэж байгаа нь судалгаагаар тогтоогдсон байдаг. Бидний судалгаагаар *H. pylori*-ийн халдварын тоон хэмжээ нэмэгдэх үед ходоодны бусад микробиомын төрөл зүйлийн хэмжээ буурч байгаа хамаарал ажиглагдлаа.

Дүгнэлт: Ходоодны архаг үрэвсэл, ходоодны хорт хавдрын урьдал өөрчлөлтийн үед *H. pylori*-ийн тоон хэмжээ ба бусад микробиомтой хэрхэн оршин байгааг тогтоолоо. Ходоодны микробиом нь ходоодны салстын өөрчлөлтөөс хамааран ялгаатай байна.

Ном зүй:

1. *Pellicano R, Smedile A, Ponzetto A, et al. How accurate is the culture of Helicobacter pylori in a clinical setting? An appraisal. Panminerva medica. 2005;47(3):191-194.*
2. *GLOBACON 2020 International agency for research on Cancer 2021 https://gco.iarc.fr/*
3. *https://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/peptic-ulcer-disease/by-country/ 2018*
4. *Ch.Bat-Erdene, Mongolian Health Indicators 2012, 2013, Center for Health Development*
5. *Study of H. pylori infection in Mongolia Kh.Oyuntsetseg, J.Sarantuya1, B.Suvd2, N.Bira*
6. *Clinical Manifestations of Helicobacter pylori-Negative Gastritis. Shiota S, Thrift AP, Green L, Shah R, Verstovsek G, Rugge M, Graham DY, El-Serag HB Clin Gastroenterol Hepatol. 2017 Jul; 15(7):1037-1046.e3.*
7. *Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, Haruma K, Asaka M, Uemura N, Malfertheiner P, faculty members of Kyoto Global Consensus Conference. Gut. 2015 Sep; 64(9):1353-67.*
8. *Boldbaatar Gantuya1,2 | Hashem B. El Serag3 | Takashi Matsumoto4 | Nadim J. Ajami5 | Tomohisa Uchida6 | Khasag Oyuntsetseg1,2 | Dashdorj Bolor7 | Yoshio Yamaoka3,4 Gastric mucosal microbiota in a Mongolian population with gastric cancer and precursor conditions Aliment Pharmacol Ther. 2020;51:770–780*
9. *Sharaf RN, Shergill AK, Odze RD, et al. Endoscopic mucosal tissue sampling. Gastrointest Endosc. 2013;78:216-224.*
10. *Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system. The American journal of surgical pathology. 1996;20(10):1161-1181.*
11. *Gastric Microbiota in Helicobacter pylori-Negative and -Positive Gastritis Among High Incidence of Gastric Cancer Area Boldbaatar Gantuya,1,2 Hashem B. El-Serag,3 Takashi Matsumoto,1 Nadim J. Ajami,4 Khasag Oyuntsetseg,2 Dashdorj Azzaya,1,2 Tomohisa Uchida,5 and Yoshio Yamaoka1,3,6,**
12. *Uchida T, Kanada R, Tsukamoto Y, et al. Immunohistochemical diagnosis of the cagA- gene genotype of Helicobacter pylori with anti-East Asian CagA-specific antibody. Cancer science. 2007;98(4):521-528.*
13. *Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: a next generation sequencing platform for genomic analysis. In: Disease Gene Identification. Springer; 2018:223-232.*
14. *Shiota S, Thrift AP, Green L, et al. Clinical Manifestations of Helicobacter pylori-Negative Gastritis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2017;15(7):1037-1046.e1033.*

The study of microbiome in chronic gastritis and gastric cancer precursor disease

Oyunbileg.N[1], Bira.N[1,2], Oyuntsetseg.Kh[1,2], Davaadorj.D[1,2], Badamjav.S[1,2], Bayarmaa.N[1,2], Enkh-Amar[1-3], Bayarsaikhan.O[1-3], Badrakh.M[1-3], Gantuya.B[1-3]

[1]Department of Gastroenterology, Mongolian National University of Medical Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia
[2]Internal Medicine Unit, Mongolia-Japan teaching hospital
[3]Endoscopy Unit, Mongolia-Japan teaching hospital
Email: gantuya@mnums.edu.mn, Tel: 94088505

Background: 16S rRNA amplicon sequencing is an accurate method of detecting microbial infection without culture. It is unclear how *Helicobacter pylori (H. pylori)* infection interacts with other gastric microbiome according to disease status
Methods: We enrolled Mongolian patients with the age of 18 who having with dyspepsia in the study. Gastric disease status was evaluated based on histological evaluation namely updated Sydney system score.
Results: We examined 161 individuals with a mean age of 43.6 years, and 64.6% were women. *H. pylori* is the most dominant bacterial species in the stomach. Using diagnostic methods 122 (75.8%) participants were *H. pylori* positive, the cutoff values were 1113 (real count number) and 4.4% (relative abundance) respectively. By the disease *H. pylori* count numbers were lowest in the normal group (10823±36215) and highest in the gastric atrophy group (75664±57999) and non-atrophy group (58614±60925) ($p<0.01$), lower in the intestinal metaplasia group (38007±46131) compared with normal group ($p<0.001$). The bacterial diversity was significantly highest in the metaplastic atrophy group and the least was in gastritis subgroups.
Conclusion: We determined the quantitative number of *H. pylori* infection and showed how it communicate with other microbiota in different kind of stomach diseases based on 16S rRNA amplicon sequencing approach. We also determined the candidate bacterial species in gastric cancer precursor disease based on gastric microbiome study.

Keywords: 16S rRNA amplicon sequencing, gastric microbiome, Helicobacter pylori