

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HELICOBACTER PYLORI* Cag A EPIYA
MOTİFLERİ İLE KLARİTROMİSİN DİRENCİ,
GASTROPATOLOJİK VE KLİNİK İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MERYEM GÜVENİR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HELICOBACTER PYLORI* Cag A EPIYA
MOTİFLERİ İLE KLARİTROMİSİN DİRENCİ,
GASTROPATOLOJİK VE KLİNİK İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERYEM GÜVENİR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özlem YILMAZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
2009.KB.SAG.055 numaralı proje ile desteklenmiştir)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin sürecinde yetişmemde büyük emeği geçen, tezimin her aşamasında sonsuz bilimsel destek ve katkılarını gördüğüm bana Amerika da araştırma olanağını sağlayan, ayrıca sadece danışman hocam olmak dışında bu zaman içinde yaşadığım problemler karşısında her zaman sabırla yanımda olan ve tezimi bitirmem için yarım bıraktığım tezimi kendisi tüm verileri tek tek toplayarak bu son haline getiren ve bu tezin bitirilmesi sağlayarak Yüksek Lisans Diplomamı almaya hak kazandıran danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem YILMAZ'a birkez daha teşekkürlerimi sunarım. Danışman hocamın arkadaşı Sayın Prof. Dr. Guillermo I PEREZ-PEREZ'e New York Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları Bölümü'nde araştırma laboratuvarında bana çalışma olanağı ve bilimsel destek sağladığı için ve tez jürimde konuk jüri üyesi olarak bulunduğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Prof. Dr. Hale AKPINAR, Prof. Dr. İlkay ŞİMŞEK, histopatoloji bulgularını tüm ayrıntıları ile değerlendiren Sayın Prof. Dr. Sölen SARIOğLU'na ve Prof. Dr. Özgöl SAğOL'a, istatistiksel bilgilendirme ve uygulama desteği aldığım Sayın Doç. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a teşekkür ederim.

Ekip ruhunu birlikte yaşadığımız ve yaşatmaya çalıştığımız, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan Araş. Gör. Bil. Uzm. Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ'e ve Bil. Uzm. Neslihan BEKMEN'e sonsuz teşekkürler.

Aileme ve tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Saygılarımla

Meryem GÜVENİR

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	ii
RESİM LİSTESİ.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Tarihçe	6
4.2. <i>Helicobacter</i> Ailesi	10
4.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Yapısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri	12
4.3.1. Bakteri Morfolojisi.....	12
4.4. Epidemiyoloji ve Prevalans.....	19
4.5. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu ve Patogenez.....	20
4.5.1. <i>Helicobacter pylori</i> ve Virulans Faktörleri	21
4.5.1.1. Adezyon Molekülleri	24
4.5.1.1.1. <i>Kan Grup Antijen Bağlayan Adezin (blood group antigen binding adhesine) (BabA)</i>	25
4.5.1.1.2. <i>Sialik asit bağlayan adezin (sialic acid binding adhesin) (SabA)(HP0725)</i>	28
4.5.1.1.3 <i>Dış membran inflamatuvar proteini (outer membrane inflammatory protein) (OipA) (HopH) (HP0638)</i>	29
4.5.1.1.4. <i>Aderans-ilişkili lipoprotein A (adherence- associated Lipoprotein A) (AlpAB)</i>	30
4.5.1.1.5. <i>Epitel kontağı ile oluşan genA (induced by contact with the epithelium) (iceA)</i>	31
4.5.1.1.6. <i>Decay akselere edici faktör (decay-accelerating factor) (DAF) (CD55)</i>	31
4.5.1.1.7. Diğer Faktörler.....	33
4.5.1.2. Vakuol Oluşturan Sitotoksin A (Vacuolating Cytotoxin Gene A) (VacA).....	33

4.5.1.3. <i>cag</i> Patojenite Adası ve CagA Proteini	37
4.5.1.3.1. EPIYA Motif.....	40
4.5.1.3.2. Tirozin Fosforilasyonuna Bağımlı Yolaklar.....	45
4.5.1.3.3. Tirozin Fosforilasyonundan Bağımsız Yolaklar.....	47
4.5.2. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Patomekanizması.....	53
4.5.3. Konak Hücre Yanıtı.....	54
4.6. <i>Helicobacter pylori</i> ile İlişkili Hastalıklar.....	58
4.6.1. İlişkili Olduğu Düşünülen Diğer Hastalıklar ve Sendromlar.....	59
4.7. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	59
4.7.1. İnvaziv Yöntemler.....	59
4.7.1.1. Biyopsi Üreaz Testi.....	59
4.7.1.2. Histopatolojik İnceleme.....	60
4.7.1.3. Kültür.....	61
4.7.1.4. <i>Helicobacter pylori</i> Moleküler Tanı Yöntemleri	63
4.7.1.4.1. Biyopsi ve Koloniden Standart PCR Yöntemi.....	63
4.7.1.4.2. Biyopsi ve Koloniden Real-time PCR.....	63
4.7.1.4.3. Mikroarray	64
4.7.1.4.4. Proteomiks.....	64
4.7.1.4.5. Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon (FISH).....	65
4.7.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler.....	66
4.7.2.1. Üre Nefes Testi (ÜNT).....	66
4.7.2.2. Serolojik Yöntemler.....	67
4.7.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	67
4.7.2.2.2. Westernblot	68
4.7.2.3. Dışkı Örneklerinde Kullanılan Tanı Yöntemleri	68
4.7.2.3.1. Dışkı Kültürü.....	68
4.7.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri.....	68
4.7.2.3.3. Dışkı PCR.....	70
4.7.2.3.4. Dışkı Real Time PCR.....	70
4.7.2.4. İdrar Antikor Testleri.....	71
4.8. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonunda Tedavi.....	71
4.9. <i>Helicobacter pylori</i> Antimikrobiyal Direncin Moleküler Mekanizması.....	72
4.9.1. Antimikrobiyal Direncin Genotiplendirilmesi.....	74

5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	76
5.1. Çalışma Grubu	76
5.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması.....	77
5.2.1. Hızlı Üreaz Testi (HUT).....	77
5.2.2. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi	78
5.2.3. Hastaların <i>Helicobacter pylori</i> yönünden değerlendirilmesi.....	78
5.2.4. Biyopsi Örneklerinin Mikrobiyolojik İncelenmesi.....	79
5.2.4.1. <i>Helicobacter pylori</i> kültür protokolü.....	79
5.3. Serum Örneklerinin Alınması, Saklanması ve Yöntemlerin Uygulanması.....	81
5.4. <i>Helicobacter pylori</i> DNA'sının Koloniden Ekstraksiyonu.....	82
5.4.1. Wizard Genomik DNA Purifikasyon Kiti Uygulaması (Promega).....	82
5.4.2. High Pure PCR Template Hazırlama Kiti Uygulaması (Roche).....	82
5.5. <i>Helicobacter pylori</i> CagA EPIYA Motif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulaması.....	84
5.5.1. Kullanılan malzemeler ve hazırlanmaları.....	84
5.5.2. DNA'nın Çoğaltılması (Amplifikasyon).....	85
5.5.3. Termal Cycler PCR Programı.....	87
5.5.4. Agaroz Jel Hazırlama.....	88
5.5.5. Elektroforez.....	88
5.6. Sekans Analizi için PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	89
5.7. Sekans Analizi.....	89
5.8. Filogenetik Analiz.....	89
5.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	90
6. BULGULAR	91
6.1. Demografik Bulgular.....	91
6.2. Hızlı Üreaz Testi ve Histopatoloji Sonuçları.....	91
6.3. <i>Helicobacter pylori</i> Kültür Sonuçları.....	98
6.4. <i>Helicobacter pylori</i> Seroloji Sonuçları.....	103
6.5. <i>Helicobacter pylori</i> cagA PCR Sonuçları.....	103
6.6. <i>Helicobacter pylori</i> CagA-Pozitif EPIYA Motif Sekans Sonuçları.....	117
6.7. <i>Helicobacter pylori</i> CagA Filogenetik Ağaç Sonuçları.....	129
7. TARTIŞMA	132
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	139

9. KAYNAKLAR	140
10. EK	160
10.1. Gönüllü Bilgilendirme Formu.....	160
10.2. Çalışma Formu	162
10.3. Etik Kurul Onayı.....	163
10.4. Özgeçmiş ve Yayın Listesi.....	169

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>Helicobacter pylori</i> virülans faktörleri.....	23
Tablo 2. CagA ile etkileşime giren proteinler ve <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonundaki rolleri.....	52
Tablo 3. <i>Helicobacter pylori</i> 'de antimikrobiyal direnci gelişmesine neden olan nokta mutasyonları.....	74
Tablo 4. <i>Helicobacter pylori</i> 'de makrolid direncinin saptanması için kullanılan genotipik metodlar	75
Tablo 5. Roma III çalışma grubuna göre fonksiyonel dispepsi ve alt gruplarının tanımı.....	76
Tablo 6. Kültür negatif 62 dispeptik hastada 27 histopatoloji ve/veya HUT pozitif veya negatifliği ile 35 <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu olumsuz hastada histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki.....	93
Tablo 7. Kültür negatif 62 dispeptik hastada 27 histopatoloji ve/veya HUT pozitif veya negatifliği ile 35 <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu olumsuz hastada histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki.....	99
Tablo 8. 124 dispeptik hastanın karakteristik özellikleri ve 62 kültür pozitif hastanın <i>cagA</i> , HUT ve histopatoloji sonuçlarının değerlendirilmesi.....	105
Tablo 9. Kültür pozitif 62 dispeptik hastada CagA virülans faktörü ile histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki.....	109
Tablo 10. Kültür pozitif 62 dispeptik hastada CagA virülans faktörü sonuçlarının histopatolojik tanı ve klaritromisin duyarlılığı ile değerlendirilmesi.....	113
Tablo 11. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde CagA pozitif ve negatif suşlarda EPIYA motif tipi, histopatolojik tanı ve değerlendirme ile klaritromisin duyarlılığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	117
Tablo 12. <i>cagA</i> pozitif 30 <i>Helicobacter pylori</i> suşunun EPIYA Motif sonuçları.....	118
Tablo 13. CagA virülans faktörü pozitif 30 <i>Helicobacter pylori</i> suşunun EPIYA motif sonuçları ile histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki.....	119
Tablo 14. CagA pozitif 30 <i>Helicobacter pylori</i> suşunun EPIYA Motif sonuçlarının karakteristik özelliği.....	126

Tablo 15. İzole edilen *Helicobacter pylori* suşlarında saptanan 30 CagA pozitif *Helicobacter pylori* suşlarının EPIYA motif sonuçlarının histopatolojik tanı ve klaritromisin duyarlılığı ile değerlendirilmesi.....127

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin madde geçişleri ve metabolik transport yolları.....	11
Şekil 2. <i>Helicobacter pylori</i> 26695 ve NCTC 11638 standart suşlarının <i>cagPAI</i> bölgelerinin karşılaştırılmalı görünümü.....	15
Şekil 3. <i>Helicobacter pylori</i> 26695 standart suşunun dairesel genomunun görünümü.....	16
Şekil 4. Kromozomal organizasyonu temelinde <i>Helicobacter pylori</i> 26695 ve J99 standart suşlarının genom sekanslarının karşılaştırılması.....	17
Şekil 5. <i>Helicobacter pylori</i> kolonizasyonu ve aderansında rol alan virulans faktörleri.....	24
Şekil 6. <i>Helicobacter pylori</i> dış membran proteini ailesi üyelerinin multiple sekans dizisi.....	32
Şekil 7. VacA'nın hücre içerisine girişi ve indüklediği sinyal yolları.....	35
Şekil 8. CagA ve VacA arasındaki antogonistik etkileşim modeli.....	37
Şekil 9. <i>Helicobacter pylori</i> 26695 standart suşunun genom yapısı ve <i>cagPAI</i> adası.....	38
Şekil 10. <i>Helicobacter pylori</i> CagA Batı ve Doğu Asya EPIYA Motifleri segmentleri.....	42
Şekil 11. <i>Helicobacter pylori</i> CagA Batı ve Doğu Asya EPIYA Motifleri aminoasit farklılıkları.....	43
Şekil 12. EPIYA tekrar bölgelerini içeren CagA'nın moleküler anatomisi.....	44
Şekil 13. <i>Helicobacter pylori</i> CagA ve SHP-2 arasındaki fiziksel ve fonksiyonel ilişki.....	47
Şekil 14. CagA ve PAR1/MAPK kinaz arasındaki etkileşim.....	49
Şekil 15. <i>Helicobacter pylori</i> patogenezi ve hücre içi yolları.....	57
Şekil 16. Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon (FISH) yönteminde <i>Helicobacter pylori</i> spesifik oligonükleotit problemleri.....	66
Şekil 17. <i>Helicobacter pylori</i> 23S rRNA domaininde gerçekleşen mutasyon ve klaritromisin direnci gelişimi.....	73
Şekil 18. <i>Helicobacter pylori</i> CagA pozitif suşların sekans analiz sonuçları.....	122-125
Şekil 19. <i>Helicobacter pylori</i> CagA filogenetik ağaç.....	130
Şekil 20. <i>Helicobacter pylori</i> CagA filogenetik ağaç.....	131

RESİM LİSTESİ

Resim 1. EPIYA PCR ürünlerinin elektroforez analiz sonuçları.....	106
Resim 2. EPIYA PCR <i>cagA</i> elektroforez analiz sonuçları.....	106
Resim 3. EPIYA PCR <i>cagA</i> elektroforez analiz sonuçları.....	107
Resim 4. <i>Helicobacter pylori</i> koloni HPU PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	107
Resim 5. <i>Helicobacter pylori</i> koloni <i>cagA</i> PCR %1.5'lik agaroz jel görüntüsü.....	108
Resim 6. <i>Helicobacter pylori</i> koloni <i>cagA</i> PCR %1.5'lik agaroz jel görüntüsü.....	108

KISALTMALAR

<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
MALT	: Gastrik mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>cagA</i>	: Sitotoksin ile ilişkili gen A
<i>vacA</i>	: Vakuol oluşturucu sitotoksin A
HUT	: Hızlı üreaz testi
HLO	: <i>Helicobacter</i> like organisms
PPV	: Olumlu öngörü değeri
NPV	: Olumsuz öngörü değeri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
IACR	: International Agency for Cancer Research
TIGR	: The Institutes of Genomic Research
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Real-time polimeraz zincir reaksiyonu
ÜNT	: Üre nefes testi
PPI	: Proton pompa inhibitörü
PNL	: Polimorfonükleer lokositler
NIH	: National Institutes of Health
σ^{28}	: Sigma faktör 28
σ^{54}	: Sigma faktör 54
LPS	: Lipopolisakkarit
OMPs	: Dış membran proteinleri
BabA	: Kan grup antijen bağlayan adezin
OipA	: Dış membran enflamatuvar protein A
SabA	: Sialik asit bağlayan adezin A
T4SS	: Tip IV Sekresyon Sistemi
TPM	: Tirozin Fosforilasyon Motifleri
Hop	: <i>Helicobacter</i> dış membran proteinleri
AlpAB	: Aderans ilişkili lipoprotein A
Le b	: Lewis b
Le a	: Lewis a

A-Lewis b	: A-Lewis b
B-Lewis b	: B-Lewis b
GalNAc	: N-asetilgalaktozamin
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
CT	: Sistein-treonin
DNase	: Deoksiribonükleaz
cag PAI	: cag patojenite adası
iceA	: Epitel kontağı ile oluşan gen A
dupA	: Duodenal ülser oluşumunu destekleyen gen A
MMPs	: Metalloproteinaz
IL	: İnterlökin
IRF1	: İnterferon regülatör faktör 1
AGS	: İnsan gastrik karsinoma hücre hattı
CCP	: Kompleman kontrol protein tekrarı
TNF α	: Tümör nekrozis faktör alfa
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
AP-1	: Erken-yanıt transkripsiyon faktör aktivatör protein 1
HP-NAP	: <i>Helicobacter pylori</i> nötrofil adherans faktör
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
ICAM-1	: Hücrelerarası adezyon molekülü 1
PE	: Fosfatidiletanolamin
Le_x	: Lewis x antijeni
Le_y	: Lewis y antijeni
kDa	: Kilodalton
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
ATPase	: P tip adenzin trifosfat
CA	: α-β karbonik anhidraz
RPTP	: Reseptör benzeri tirozin fosfataz proteinleri
F-aktin	: Filamentöz aktin
CD2AP	: CD-2 ilişkili protein
PG I	: Pepsinojen I
PG II	: Pepsinojen II
Nod1	: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon domaini içeren 1
BFA	: Brefeldin A

SHP-2	: Src-homoloji 2 (SH2) içeren tirozin fosfataz 2
Csk	: C-terminal Src kinaz
FAK	: Fokal aktivasyon kinaz
PTP	: Katalitik protein tirozin fosfataz
CM	: CagA multimerizasyonu
WSS	: Batı-CagA spesifik sekansı
PAR1	: Partioning-defective-1
MARK	: Microtubule affinity regulating kinase
Apkc	: Atipik protein kinaz C kompleksi
JAM	: Junctional adhesion molecule
Z0-1	: Zonula occludens-1
EPLIN	: Epithel protein lost in neoplasm
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
NIK	: NF- κ B uyarıcı kinaz
PAK1	: P21 uyarıcı kinaz 1
Tipalpha	: TNF- α uyarıcı protein gen ailesi
IKK	: I κ B kinaz
CRE	: cAMP yanıt elemanları
TLR	: Toll-like reseptör
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
MIF	: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
PCA	: Parietal hücrelere karşı oluşan antikorlar
NSAİİ	: Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaç
H&E	: Hematoksilen-eozin
PCR-RFLP	: PCR-restriksiyon fragment length polimorfizm
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi
2D-GE	: İki boyutlu jel elektroforezi
MS	: Kütle spektrometresi
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
HpSA	: Dışkı antijen testleri
PBP1	: Penisilin bağlayan protein 1
MIC	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
TBE	: Tris borik EDTA

SPSS	: Statistical package for the social sciences
SD	: Standart deviasyonu
DU	: Duodenal ülser
GU	: Gastrik ülser
GC	: Gastrik kanser

1. ÖZET

***Helicobacter pylori* CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkinin araştırılması**

Meryem Güvenir

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, 35340 İzmir

Helicobacter pylori (*H. pylori*)’de CagA’nın tirozin fosforilasyonu CagA proteininin C-terminal bölgesinde çeşitli sayılarda bulunan beş aminoasit sekansından (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) oluşan EPIYA tekrar sekansları ile gerçekleşir. *H. pylori* suşlarımızdaki CagA EPIYA motiflerinin sayısı ve tiplerinin saptanması, histopatolojik korelasyonun ve ayrıca bu motiflerin klaritromisin direnci ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Endoskopi endikasyonu konulan dispeptik yakınmalı 124 hasta çalışmaya alındı. *H. pylori* suşlarının *cagA* pozitifliği PCR ile ürün uzunluğu 370-570 bp olarak saptandı. Amplifiye edilen PCR ürünleri QIAquick PCR kiti ile purifiye edildi ve sekans analizi için Macrogen’e gönderildi. Anti-*H. pylori* IgG ve CagA IgG antikorları ELISA yöntemi ile çalışıldı. Yüz yirmi dört hastanın 89 (%71.8)’u HUT, histopatoloji ve kültürün en az ikisinin olumluluğunda *H. pylori* enfeksiyonu olumlu saptandı. Altmış iki (%50) *H. pylori* kültür pozitif hasta suşlarından; 30 (%48.4)’u *cagA* pozitif, 32 (%51.6)’si *cagA* negatif saptandı. *cagA* pozitif hastalarımızda; 21 (%70)’i EPIYA-ABC, yedi (%23.3)’si EPIYA-ABCC ve iki (%6.7)’si ise hem EPIYA-ABC hem de -ABCC olmak üzere miks enfeksiyon saptandı. Ayrıca, 89 *H. pylori* pozitif hastanın 77 (%86.5)’si anti-*H. pylori* IgG antikor; 14 (%46.6)’ü anti-CagA IgG antikor olumlu bulundu. Sonuç olarak, *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının antrum ve korpus pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) ve korpus atrofi ile ilişkisi olduğu saptandı. EPIYA motifleri ile histopatoloji ve klaritromisin direnci arasında bir korelasyon gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, CagA, EPIYA motif

2. SUMMARY

Determination of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA motifs and their association with clarithromycin resistance, gastropathology and clinical outcome

Meryem Güvenir

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, 35340 İzmir

Tyrosine phosphorylation of CagA in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) occurs at the EPIYA motif region, a five aminoacid sequence (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) that is present in variable numbers in the C-terminal EPIYA repeat region of the CagA protein. The aim of the study was to identify the 3' variable regions of the *cagA* gene of the *H.pylori* CagA EPIYA motifs in *H.pylori* strains and correlate with histopathological findings in patients' biopsies and also identify the relationship between EPIYA motifs and clarithromycin resistance. A total of 124 patients with dyspepsia referred to upper endoscopy were included. *H.pylori* strains' *cagA* status was established. *H.pylori cagA* positive PCR products ranging 370-570 bp were amplified. PCR products purified by QIAquick PCR kit and sent to MacroGen for sequencing. Anti-*H.pylori* IgG and CagA IgG antibodies were determined by ELISA tests. Eighty-nine of 124 patients (71.8%) were *H.pylori* infection positive by at least two positivity of RUT, histopathology and culture. Sixty-two patients (50%) were positive by culture. Among *H.pylori*-culture positive patients; 30 (48.4%) were *cagA* positive, 32 (51.6%) were *cagA* negative. Among the 30 *cagA* positive strains; 21 (70%) had EPIYA-ABC, seven (23.3%) had EPIYA-ABCC and strains from two patients (6.7%) had both EPIYA-ABC and -ABCC. In 89 *H.pylori* positive patients; 77 (86.5%) were anti-*H.pylori* IgG, 14 (46.6%) were anti-CagA IgG positive. As a conclusion, *cagA* positive *H.pylori* strains were related to inflammation of pits (active inflammation) in antrum and corpus and atrophy in corpus. The correlation could not be found between EPIYA motifs and histopathology and clarithromycin resistance.

Keywords: *Helicobacter pylori*, CagA, EPIYA motif

3. GİRİŞ VE AMAC:

Helicobacter pylori (*H. pylori*), spiral yapıda, flajellalı, insan gastrik epitel hücresinde kolonize olan Gram negatif mikroaerofilik bir bakteridir (1-4). *H. pylori* ile ilişkili gastrik hastalıkların peptik ülser, duodenal ülser, atrofik gastrit, gastrik mukozal-ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma, gastrik kanser ve non-kardia gastrik adenokarsinoma riskini arttırdığı bildirilmiştir (5-7). 1994 yılında, "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından *H. pylori*'nin insanlarda karsinogenez oluşumuna neden olduğu bildirilmiş (8) ve Sınıf I karsinogen olarak sınıflandırılmıştır (9-11).

H. pylori'nin doğal habitatı insan midesidir, ancak yaşam boyu enfeksiyona neden olabileceğinden diğer habitatlarda da yaşayabildiği bildirilmiştir. İnsandan insana geçiş olası bulaş şeklidir. Fekal-oral ve oral-oral bulaş da bildirilmiştir (5,6,8,12,13). En az görülen bulaş yolu bir kişinin gastrik mukoza ile enfekte olan tüpler, endoskoplar ve materyaller ile başka kişilere bulaşma şekli (iatrojenik)dir. Fekal-oral bulaş en önemli olanlar arasında yer alır. *H. pylori* enfeksiyonu ile enfekte çocukların dışkılarından *H. pylori* izolasyonu yapılmış olmasına rağmen, fekal izolasyon çok fazla yaygın değildir. Besin yoluyla bulaş da ispatlanmıştır. Kusmuktan *H. pylori*'nin aspirasyon ile bulaşı diğer bir olasılık olarak düşünülmektedir (8). *H. pylori* diş plaklarından, insan ve hayvan feçeslerinden izole edilmiştir ve birçok çalışmanın sonucunda *H. pylori*'nin akuatik (suda yaşayan) çevrelerde bulunduğu bildirilmiştir (6,14).

H. pylori prevalansı geniş bir coğrafik çeşitlilik göstermektedir. Coğrafik bölgelerde, *H. pylori* prevalansı çocukluk çağı boyunca yaşanan ortamdaki sosyoekonomik durum ile ters bir korelasyon göstermektedir. *H. pylori* prevalansı en yüksek %69 en düşük ise %11 olduğu bildirilmiştir (15). Batı ülkelerinde, *H. pylori* prevalansı genellikle gelişmekte olan ülkelerde birinci ve ikinci jenerasyondan yapılan göçler arasında oldukça önemli bir fark gözlenmiştir (6).

H. pylori insanlarda enfeksiyon oluşturur ve bazı populasyonlarda %80'e kadar yüksek prevalans gösterir (2). Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı %70-90, gelişmiş ülkelerde %25-50'dir (10).

H. pylori'nin hastalık yapabilme yeteneğinin; suşların virülans özelliklerine, konağın genetik özelliğine ve çevresel faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (2). Yapılan birçok araştırmalar sonucunda kolonize olmasını sağlayan faktörlerin; hareketli olması, çevreyi

algılaması, kemotaksi, demiri kullanması ve mide asidine karşı dayanıklılık olduğu bildirilmiştir (16). *H. pylori* solunum metabolizmasına sahip mikroaerofilik bir bakteridir. Bu sebepten dolayı; *H. pylori* genom sekansında çeşitli glukoz-oksidaz yolağı enzimleri ve TCA döngüsü enzimlerini kodlayan genler bulunur. Karbon kaynağı olarak; glikoz, aminoasitler ve bazı organik asitleri kullanabilir (17). *H. pylori* enfeksiyonu tanısında invaziv olmayan yöntemler; ¹³C- ve ¹⁴C- üre nefes testi (ÜNT), dışkı antijen testleri (poliklonal antikor ve monoklonal antikor), dışkı PCR, dışkı Real-time PCR ve immunolojik testler (serum, tükürük ve idrarda antikor)'dir (5,18-20). İnvaziv testler ise biyopsi temelli olup gastrik dokuda bakterinin varlığını saptayan hızlı üreaz testi (HUT), histopatoloji, kültür, biyopsi PCR ve real-time PCR (RT-PCR)'dir (6,18,20). ¹³C-ÜNT testi aynı hastada, çocuklarda, hamile bayanlarda tekrar uygulanabilen güvenilir ve basit bir testtir (21). ¹³C-ÜNT ayrıca tedaviden dört hafta sonra *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunu göstermek için kullanılan bir yöntemdir (19,21). *H. pylori* enfeksiyonunda kültür ve ÜNT altın standart yöntemlerdir. Maastricht 3-2005 Consensus Raporu'na göre, *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda birçok tedavi protokolü bulunmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu tedavisi için proton pompa inhibitörü (PPI) ve iki antibiyotikten (klaritromisin, amoksisilin veya metronidazol) oluşan üçlü tedavi birinci basamak tedavide kullanılmaktadır (19).

H. pylori'nin patogenezi vakuol oluşturan sitotoksin A (VacA), kan grup antijeni bağlayan adezin (BabA), nötrofil-aktive edici protein (HP-NAP), dış inflamatuvar protein A (OipA), duodenal-ülser oluşumunu destekleyen gen (*dupA*) ve *cag* patojenite adası (*cag* PAI) ile ilişkilidir (22,23). Sitotoksin-ilişkili gen A (*cagA*) tip IV sekresyon sistemi (T4SS) komponentlerini de kodlayan *cag*PAI içerisinde 40-kilo bazlık DNA segmenti olarak lokalize halde bulunur (11,22,24). "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılan *H. pylori cagA* gen özelliğine göre *sitotoksin ilişkili gen A (cagA)*-pozitif ve *cagA*-negatif suşlar, olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Ancak *cagA*-pozitif suşların gastrik mukozaya zarar verme yeteneği daha fazla olduğu bildirilmektedir (24). *cagA* geninin kodladığı ~120–145 kDa'luk CagA proteini tip IV sekresyon sistemi ile gastrik epitel hücreye girerek plazma membranına yerleşmektedir. CagA sitozol içinde Src kinaz ailesi tarafından fosforillenir ve Src homoloji iki domain içeren tirozin fosfataz (SHP-2) ile etkileşime girerek "hummingbird" fenotipi oluşur. CagA'nın tirozin fosforilasyonu proteinin C-terminalinde farklı sayılarda bulunabilen beş aminoasitten (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) oluşan EPIYA motif bölgesinde gerçekleşir (7,9,22,25) ve CagA'nın

fosforilasyonu EPIYA sekansını içeren tirozin fosforilasyon motifleri (TPM) ile olmaktadır (26). CagA iki ana alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Avrupa, Afrika, Amerika, Avustralya (Batı CagA) da bulunan *H. pylori* suşları ve Doğu Asya ülkelerini içeren Japonya, Kore ve Çin de (Doğu Asya CagA) bulunan *H. pylori* suşlarıdır. Kore, Japonya ve Çin gibi Doğu Asya ülkelerinde *cagA* pozitifliği %90'dan fazladır ancak Batı ülkelerinde ise %50-60 oranındadır (25). *H. pylori*'nin genetik yapısı her suşta yaklaşık %20 oranında değişiklik gösterebilmektedir. CagA EPIYA motifleri çeşitliliğinin, *H. pylori* patogeneğinde önemli bir role sahip olabileceği belirtilmektedir. Doğu popülasyonundan izole edilen EPIYA motif sayısı fazla olan CagA pozitif suşların daha şiddetli aktif kronik gastrit ve atrofi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (22). Bu nedenle *H. pylori* suşlarındaki EPIYA motiflerinin sayısının ve tipinin doğru olarak belirlenmesinin kuvvetli bir prognostik araç olabileceği ve EPIYA motiflerinin sayısının farklı klinik sonuçlar ile ilişkisi olabileceğini öngörmekteyiz.

Bu araştırmanın amacı; Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde endoskopi endikasyonu konulan hastalardan antrum ve korpustan alınan gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarında CagA EPIYA motiflerinin sayısı ve tipinin belirlenmesi ve klaritromisin direncindeki artış ve eradikasyon başarısızlığı nedeniyle klaritromisin direncinde EPIYA motiflerinin rolünün ve aralarındaki korelasyonun araştırılmasıdır. Ayrıca, EPIYA motifleri ve histopatolojik bulgular arasında bir ilişki olup olmadığı bugüne kadar yapılan çalışmalarda tam olarak belirlenememiştir. Erişkin dispeptik hasta grubumuzun güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilen histopatolojik bulguları ile EPIYA motifleri arasındaki ilişkinin varlığının araştırılması da amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

19'uncu ve 20'inci yüzyıllarda, birçok araştırmacı hayvanların midelerinde spiral mikroorganizmaların olduğunu rapor etmişlerdir (6). Hayvanlarda spiral bakteriler ilk kez Rappin tarafından 1881'de, Bizzozero tarafından 1893'te (27-29) ve Salomon tarafından 1896'da kedi, köpek ve sıçanların midesindeki bu spiral bakterilerin farelerden geçmiş olabileceği bildirilmiştir (27,29). Benzer spiral bakteriler peptik ülser veya gastrik kanser olan hastalarda da gözlenmeye başlanmıştır (6). Jaworski 1899'da Polonya'da gastrik yıkama suyunun sedimentinde spiral mikroorganizmaları tanımlamıştır (28,29).

Balfour 1906'da gastrik ülserli maymun ve köpeklerin, Krienitz ise gastrik kanserli bir hastanın gastrik örneklerinde spiral mikroorganizmaları tanımlamışlardır (30,31). Luck ve Seth midedeki üreaz aktivitesinin antibiyotik tedavisi ile kaybolduğunu bildirdiler. Ancak gastrik mikroorganizmalar ile ilişki 1984'e kadar kurulamadı. Doenges 1938 yılında, otopsi örneklerinin % 43'ünün midesinde spiral mikroorganizmaları saptadı. Örnekler postmortem toplandığından kontaminasyon riski nedeniyle bu bulgular şüpheyle karşılandı (29,31). İki yıl sonra mide ülserli ve kanserli hastaların cerrahi örneklerinde de spiroket saptanarak mikroorganizmanın bir postmortem kontaminant olmadığını ve gastrik bir patojen olduğunu destekledi (29).

Freedburg ve Baron 1940 yılında midede kıvrımlı mikroorganizmalar olduğunu bildirdi. 1950 yılında Fitzgerald ve Murphy tarafından peptik ülser hastalığı ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişki olduğu gösterildi (31). Palmer 1954'te, insan mide biyopsi örneklerinde yaptığı incelemede bakteriye rastlamadığından gastrik ortamdaki tüm bakterilerin kontaminant olduğunu bildirdi. Salgılanan asit nedeniyle mide lümeninin steril olduğu, mukozal lezyonlara gastrik asiditenin neden olduğu düşünüldü. 1910 yılında Schwartz'ın "no acid no ulcer" kavramı kabul edildi (29).

1959 yılında Liebre ve Le Fevre tetrasiklin tedavisinden sonra midede üreaz aktivitesinin kaybolduğunu ve bu enzimin bakteri kaynaklı olabileceğini bildirdiler. 1968 yılında Delluva germ-free hayvanlarda midede üreaz bulunmadığını ve bu enzimin bakteri kaynaklı olduğunu saptadı (31).

1975'de Steer ve Colin-Jones, gastrik mukozada mukus salgılayan hücrelerle ilişkili, en az bir flajeli bulunan spiral bakterileri tanımladılar ve bu bakterilere yanıt olarak

polimorfonükleer lökositlerin (PNL) gastrik mukozaya göç ettiklerini öne sürdüler. Biyopsi örnekleri kültüre alındı. Ancak kültürde spiral bakteriler değil, sadece *Pseudomonas aeruginosa* üretildi. Dört yıl sonra Fung ve arkadaşları kronik gastritli hastaların gastrik mukozalarında histolojik ve yapısal olarak bakteriyi gösterdiler. Ancak mukozal lezyonlarla ilişkisi saptanamadı (30,31).

J. Robin Warren ise *Campylobacter jejuni*'ye benzeyen spiral bakterinin mide hastalıklarıyla ilişkisini ve midenin steril olmadığını bildirdi. J. Robin Warren ve Barry Marshall biyopsi örneklerini *Campylobacter* ve nonselektif besiyerinde 48 saat inkube ettiler. Fakat üreme saptanmadı. 1982'de beş günlük paskalya tatilinden döndüklerinde *Campylobacter*'e benzer bakterilerin bir tane kültürde ürediğini gördüler. Bu gelişmenin ardından; 11 hastadan bakteri izole edildi ve morfolojik olarak *Campylobacter*'e benzediğinden "*Campylobacter* like organisms" adı verildi (6,8,11,30,31). 1983'te Lancet'e yazılan bir mektupta Warren ve Marshall *H. pylori* enfeksiyonu ve peptik ülser hastalığı arasında bir bağlantı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Marshall bir trilyonun ($>10^9$) üzerinde *H. pylori* içeren kültür buyyonu içerek kendini inokule etmiş ve bakterinin bir patojen mi yoksa enflamasyonlu mide mukozasını kolonize eden bir kommensal mi olduğunu bulmaya çalışmıştır. Sekiz gün içinde akut gastrit geliştirmiş ve *H. pylori*'nin gastrite neden olduğunu doğrulamıştır (30).

1984'de Warren ve Marshall tarafından diğer *Campylobacter* türlerini yapısal benzerliği nedeniyle *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırıldı fakat '*pyloridis*' Latin terim olarak doğru olmadığından 1987'de tür ismi '*pylori*' ye değiştirildi (29,31). 1986'da yoğun üreaz salgıladığı kanıtlandı (31). 1987'de *Campylobacter pylori* adını aldı (31). 1989'da Goodwin ve arkadaşları bakterinin *Campylobacter* ailesine ait olmadığını gösterip genus adını farklı fonksiyonlar ve enzimatik özelliklerinden dolayı *Helicobacter pylori* adını verdiler (12,31,32). *Helicobacter* ismi Yunan dilinde spiral anlamına gelen "**hēlix/ἕλιξ**" kelimesinden türetilmiştir (28). Yapılan yeni çalışmalara göre; *H. pylori*'nin insanlarda 60,000 yıldır enfeksiyon oluşturduğu ve genetik transformasyonun insaninki ile benzer zamanlarda gerçekleştiği için insan göçü ve farklılaşma araştırmalarında model olarak düşünülmektedir. İnsan popülasyonunun coğrafik dağılımı olarak Doğu Afrikadan başlayarak Batı Avrupaya, Doğu Asya'ya ve Güney Afrika'ya dağıldığı bilinmektedir. *H. pylori* suşlarının ise; benzer şekilde coğrafik dağılımı olarak Avrupa için bir kısım, Asya için iki kısım ve Afrika için üç kısım olmak üzere dağılım gösterdiği bilinmektedir (33).

1994'de "National Institutes of Health (NIH)" tarafından *H. pylori*'nin peptik ülserin birincil nedeni; "IACR" tarafından sınıf I karsinojen olduğu bildirildi (11,34,35).

1997 yılında "The Institute for Genomic Research (TIGR)" tarafından *H. pylori*'nin tam genom haritası yayınlamıştır (36).

3 Ekim 2005 yılında da **J. Roben Warren ve Barry Marshall** *H. pylori*'yi, peptik ülser ve gastritteki rolünü gösterdikleri için "**Nobel Tıp Ödülü**" aldılar. (6,31,20,37,38).



Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine

3 October 2005

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet has today decided to award

The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005

jointly to

Barry J. Marshall and J. Robin Warren

for their discovery of

"the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease"

Inventas vitam juvat excoluisse per artes

"And they who bettered life on earth by new found mastery."

(inventions enhance life which is beautified through art.)



4.2. *Helicobacter* Ailesi

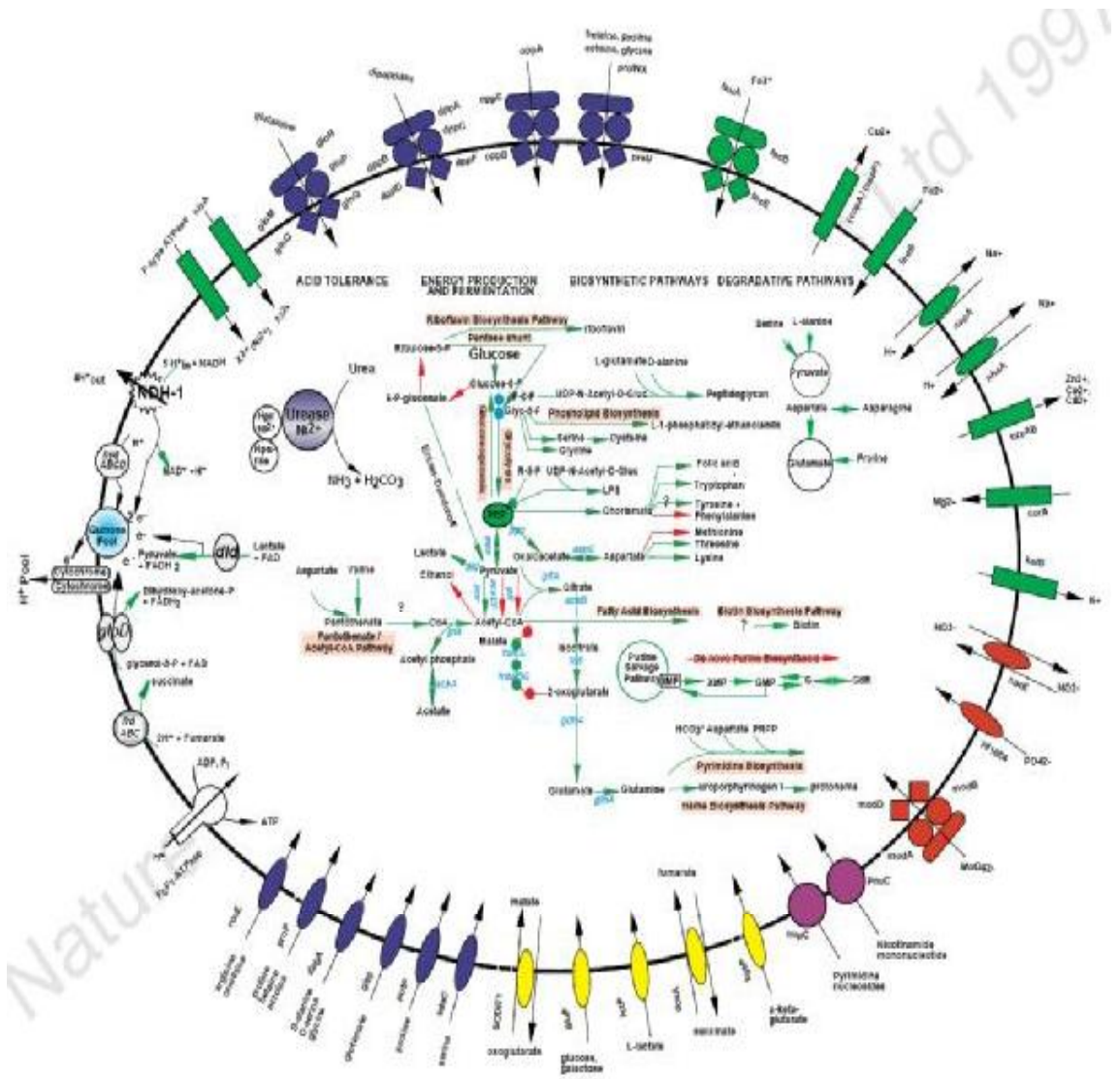
Helicobacter ailesi (bu genusta en az 22 tür), 0.3-1.0 µm en ve 1.5-10 µm boyda spiral veya kıvrımlı basilleri içerir. *Helicobacter* türleri Gram-negatif, spor oluşturmeyen basillerdir (6,8,12,27). İnsanlardan izole edilen *Helicobacter spp.*'nin içerdiği türler; *H. pylori*, *H. cinaedi*, *H. jennelliae*, *H. heilmannii* (eski adı *Gastrospirillum hominis*), *H. westmeadii*, *H. canis*, *H. canadensis sp.*, *H. pullorum* ve *H. rappini* (eski adı *Flexispira rappini*). Bu türlerden *H. pylori*, *H. cinaedi* ve *H. jennelliae* önemli insan patojenleri olarak bildirilmiştir (12). *H. pylori* uzamış kültürlerde küresel veya kok şekline dönüşür, hareketli ve genellikle çok sayıda bipolar kılıflı flajellaları vardır. Diğer *Helicobacter* türlerinden farklı olarak *H. pylori*'nin çok sayıda, monopolar, kılıflı flajellası vardır (6,8,12,27).

Çeşitli *Helicobacter*'ler (örneğin *Helicobacter pullorum* ve *Helicobacter canadensis*) *Campylobacter*'ler gibi kılıfsız flajella içerir (8,27). Tüm *Helicobacter*'ler oksidaz pozitifdir. Karşılaştırmalı genomik analizler, *H. pylori*'de pentoz-fosfat yolu, Entner-Doudoroff yolu, glikoliz, Krebs reaksiyonunun siklik olmayan şekli gibi önemli katabolik yolların bulunduğunu desteklemektedir. *Helicobacter* türleri, memelilerin ve kuşların gastrointestinal ve hepatobiliyer sistemlerinden izole edilmiştir (8,27). *Helicobacter* ailesi diğer Gram negatif kıvrımlı basillerden (örneğin *Campylobacter*) enzimatik aktiviteleri, yağ asidi profilleri, üreme özellikleri, nükleik asit hibridizasyon profilleri ve 16S rRNA sekans analizlerine göre ayrılır. *Campylobacter jejuni* ve *H. pylori* genomlarının sekanslanmasıyla da *Campylobacter* ve *Helicobacter* organizmaları arasındaki farklılıklar kanıtlanmıştır (3,8,27).

Spiral yapıya sahip olan *Helicobacter felis* (*H. felis*) ilk kez kedi midesinden izole edildi ve daha sonra da köpek midesinde gözlendi. *H. felis* zoonotik potansiyeli olan *Helicobacter* türlerinden birisidir. Morfolojisinde identifikasyonda önemli olan tipik periplazmik fiberler bulunan helikal bir yapıya sahiptir. Üreaz gen ailesine ve ayrıca iki flagellin genine (*flaA* ve *flaB*) sahiptir (6).

H. mustelae, *H. pylori*'den kısa bir süre sonra izole edildi ve *Campylobacter pylori subsp. mustelae* olarak sınıflandırıldı. *H. mustelae* 16S rRNA gen sekans analizi, üreaz sekans analizi ve yağ asidi profiline göre filogenetik olarak enterohepatik *Helicobacter* türlerine yakın olduğu gösterilmiş ancak ferretlerde (dağgelinciği) enterik kolonizasyona neden olduğu saptanamamıştır (6).

H. heilmannii; geniş bir konak aralığına sahip *Helicobacter* türüdür. *H. heilmannii* birkaç evcil hayvan, kedi, köpek ve insan olmayan primatlar içeren yabani hayvanlardan izole edilmiştir. Morfolojik olarak *H. felis*'e benzer ancak periplazmik fiber yapısı yoktur (6). *H. heilmannii* insan gastrik biyopsi örneklerinde tanımlanmış, kültürde üretilmiştir. İnsanlarda gastritin sık olmayan bir nedenidir, düşük sayıda gastriti olan hastalarda da gözlemlendiği bildirilmiştir ve nadir izole edilir (6,8,27). *H. pylori*'ye göre daha uzun ve daha sık kıvrımları olan bir bakteridir (26).



Şekil 1. *Helicobacter pylori* 'nin madde geçişleri ve metabolik transport yolları

*36' ıncı kaynaktan alınmıştır.

4.3. *Helicobacter pylori*'nin Yapısı ve Mikrobiyolojik Özellikleri

4.3.1. Bakterinin Morfolojisi

Gram negatif, küçük, kıvrımlı, martı kanadı ve “U” şeklinde basiller ile zayıf β hemoliz görülür. *H. pylori* suşları sitokrom oksidaz, katalaz ve hızlı üreaz aktivitesi gösterirler (27,39). Gram boyama ile genellikle soluk boyanır, karbol fuksin ile zıt boyama daha belirginleştirici olabilir. Faz-kontrast mikroskobu ile birçok *Helicobacter* suşlarının hareketi görülür (27).

H. pylori, basil yapısında dört ile yedi arasında değişebilen polar flajellere sahip bir bakteridir (17). *H. pylori*'nin iki farklı morfolojik şekli bulunur; metabolik olarak aktif, çoğalabilen spiral şekli ve kültürü yapılamayan (non-culturable) kokoid şekli. Spiral şekilden kokoid şekline dönüşüm; aerobik ortam, inkübasyon süresinin uzatılması, yüksek sıcaklık, PPI, açlık ve antibiyotik tedavisi gibi çeşitli koşullar altında gerçekleştiği bildirilmiştir (4). *H. pylori*'nin *in vitro* koşullarda kültürü yapıldığında, basil form oluşur ancak uygun olmayan koşullar altında basil formun kokoid formuna dönüştüğü bilinmektedir (40). Bununla birlikte; kokoid şekli hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda gözlenmiştir ancak *H. pylori* patogenezinde rolünün olup olmadığı tartışmalıdır (41). *H. pylori*'nin çevreden konağa bulaş mekanizması henüz daha tam olarak bilinmemektedir, fakat *H. pylori* kokoid şeklinin besin ve su kaynaklarından enfeksiyonu taşıyan bir araç gibi olduğu bildirilmiştir (42). *H. pylori*'nin kokoid forma dönüşümünün bakterinin çevreye karşı adaptasyonu ve korunma mekanizması görevi olan aktif bir süreç olarak gösterilmiştir (43).

i. Flajellanın Yapısı

H. pylori flajeli çeşitli özelliklerinden dolayı diğer flajellerden farklılık gösterir. İlk olarak, protein altbirimleri olan FlaA ve FlaB'den meydana gelir. Diğer hareketli bakterilerin flajel yapılarının tek bir protein altbiriminden oluştuğu gösterilmiştir. *H. pylori* flajel yapısında bulunan FlaA majör bileşen ve FlaB minör bileşendir, ancak her ikisinde önemlidir (16).

İkinci farklı özellik olarak; *flaA* ve *flaB* genlerinin yalnızca kromozomun farklı kısımlarında lokalize bulunmaları değil kontrollerinin de farklı moleküller tarafından yapılmasıdır. *flaA* geninin transkripsiyonu için sigma faktör 28 (α^{28}) gerekli, *flaB* geni için ise sigma faktör 54 (α^{54}) gereklidir (17). Bununla beraber; *H. pylori*'nin flajel yapısı ile ilişkili birçok gen bulunur. *flaA*, *flaB*, *flaE*, *fliD*'nin yanında henüz tam olarak görevi

tanımlanamayan diğler bir gen ise *flaK*'dır. Flajel genleri ve ilişkili oldukları proteinler *H. pylori* enfeksiyonuna karşı tedavi ve aşı geliştirmede hedef olarak düşünölmektedir (44).

ii. Hücre Duvar Yapısı

H. pylori'nin hücre duvar yapısı diğler Gram negatif bakteriler ile benzerlik göstermektedir. Hücre duvarı; iç (sitoplazmik) membran, peptidoglikan, periplazmik boşluk ve dış membrandan oluşur. Dış membran ise fosfolipid ve lipopolisakkarit (LPS) içerir. *H. pylori*'nin dış membranda bulunan fosfolipid kısmı bakterilerde nadir bulunan kolesterol glukozidaz içerir. LPS ise genellikle lipid A, iç oligosakkarit ve O yan zincirinden oluşmaktadır (44) Hücre duvar yapısı ile ilgili tüm detaylı bilgiler adezyon molekülleri bölümünde sayfa 24'te yer almaktadır.

iii. Genom Yapısı

H. pylori yaklaşık 1.7 Mbp'lık küçük bir genoma sahiptir (17). *cag* PAI 40 kb'dır ve kromozomal glutamaz rasemaz genin de bulunur (45). Bu segment ayrıca CagA translokasyonu için gerekli olan T4SS'i kodlar (9). CagA, karboksi-terminal değışken bölgesinde bulunan 120-145 kDa'luk bir proteindir. *cag* PAI için belirleyici olarak *cagA* kullanıldığında; *H. pylori* *cagA*-pozitif ve *cagA*-negatif olmak üzere iki gruba ayrılır. *cagA*-pozitif *H. pylori* suşlarının yüksek seviyede gastrik enflamasyona ve *cagA*-negatif suşlara göre daha çok virulan olduğu bilinmektedir (46). CagA translokasyonu için diğler iki faktör ise; Cagβ ve CagF olduğu bulunmuştur. Cagβ, CagA'nın bakteriyel iç membrana geçmesini sağlar, CagF ise CagA'nın C-terminal sekresyon sinyali bölgesi ile etkileşime giren şaperon-benzeri proteindir (47).

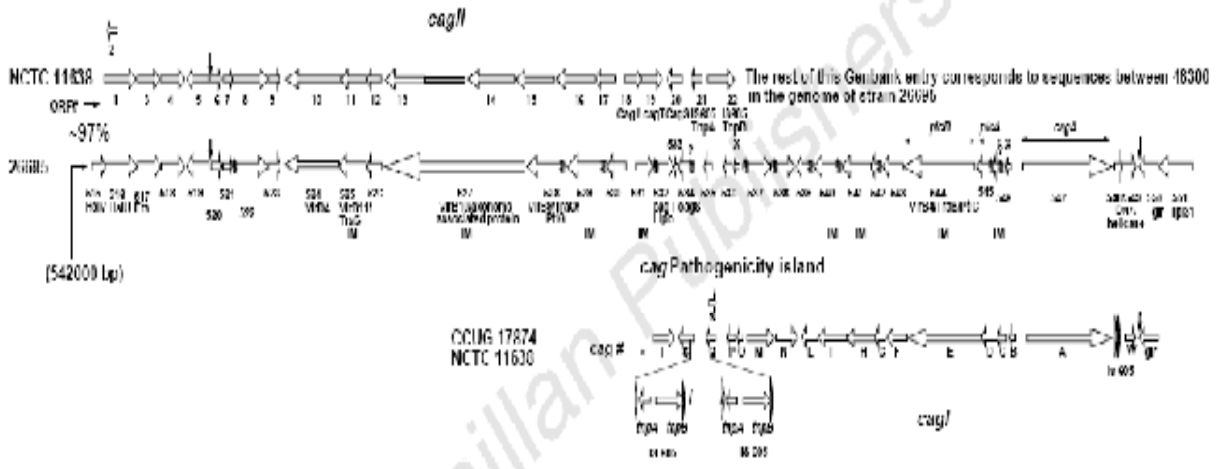
H. pylori'nin genomundaki değışken (plasticity) bölge, izolatlar arasında farklılık gösteren DNA bölgesidir. *H. pylori* genomundaki bu bölge her suşun genomik sekansında %20'den fazla farklılık gösterir; bu nedenle suşlar arasında büyük bir genetik çeşitlilik bulunmaktadır (48). Occhialini ve ark. Costa Rica'da 17 gastrik kanser ve 26 gastritli hasta grubunun değışken bölgesinden (*dupA* geni içermeyen *H. pylori*) 20 tane open reading frame'i araştırarak, gastrik kanserli hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında genellikle *jph0947* ve *jph0940* bulunduğunu bildirmişlerdir (49). Değışken bölgedeki bazı genlerin veya genlerin kombinasyonunun *H. pylori* ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki patogeneizde kritik role sahip olabilecekleri düşünölmektedir (50).

H. pylori 26695 standart suş genomu; 1,667,867 baz çifti (bp) ve G+C içeriği %39 olan dairesel bir kromozomdan oluşur (Şekil 2, 3). Genomdaki beş bölge G+C kompozisyonu açısından önemli derecede farklılık gösterir. Bu bölgelerden iki tanesi IS605 insersiyon sekansından bir veya daha fazla kopyasını içermektedir ve bir ucunda 5S ribozomal RNA sekansı ve diğer ucunda 521 bp tekrar bölgesi (tekrar 7) bulunmaktadır. Bu iki bölge ayrıca DNA proçesi için gerekli olan genleri ve *Agrobacterium*'da onkogenik T-DNA transferi için ve *Bordetella pertussis*'in pertussis toksini salgılanması için gerekli olan virB4/ptl genini içerdiklerinden önemlidir. Diğer bir bölge de 31-bp'lık direkt tekrarlardan oluşan ve lateral transfer ile meydana gelen *cag* PAI'yi içermektedir (36,51). Kromozomda 0.47'den 3.8 kb kadar değişkenlik gösteren sekiz tekrar ailesi (tekrar 8) (>%97 benzer) bulunmuştur. Tekrar 7'nin üyeleri intergenik (genler arasında) bölgede bulunurken diğerleri kodlama sekansları ile ilişkilidir ve gen duplikasyonlarını temsil ettikleri düşünülmektedir. Tekrar 1, 2, 3 ve 6 dış membran proteinlerini (OMP) kodlayan genler ile ilişkilidir (36,51).

Replikasyon, hücre bölünmesi ve sekresyonun temel mekanizmasını oluşturan *H. pylori* genomu *E. coli* ve *H. influenzae* bakterileri ile benzer bulunmuştur. Ancak, önemli farklılıklar da bulunmaktadır. Örneğin, *H. pylori* genomunda DnaC, MinC ortoloğu ve salgı şaperonu SecB bulunmamaktadır. *H. pylori* de DnaC'nin eksik olması ya yeni replikasyon, hücre bölünmesi ve sekresyonun temel mekanizması için DnaB'nin varlığı yeterli olduğundan ya da DnaC'ye sekans benzerliği olmasa bile bir ortoloğun bulunduğu bildirilmektedir (36).

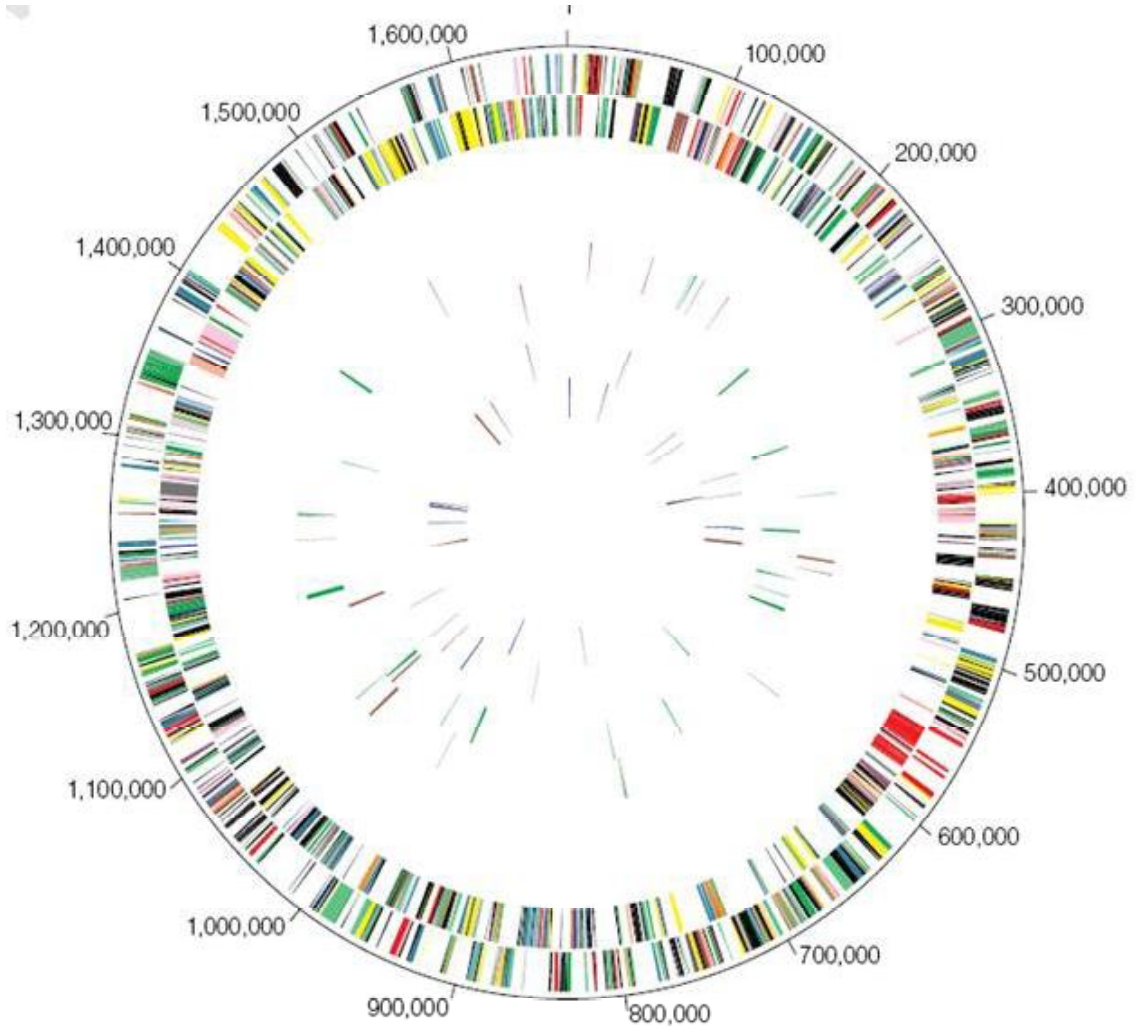
H. pylori klasik bakteriyal şaperon seti (DnaK, DnaJ, CbpA, GrpE, GroEL ve HtpG) ne sahiptir. *H. pylori* şaperon genlerinin transkripsiyonlarının regülasyonu *E. coli*'ninkinden farklıdır. *E. coli*'de bulunan sigma faktörlerinin (heat-shock sigma 32 ve stationary phase sigma S) *H. pylori*'de bulunmadığı bildirilmiştir (36). SecA-bağımlı salgı yolağına ek olarak; *H. pylori* iki tane özel eksport sistemine sahiptir. Bir tanesi *cag* PAI ile ilişkilidir ve diğeri de FliH, FliI, FliP, FlhA, FlhB, FliQ, FliR ve FliP ortologlarından oluşmuş flajellar eksport yolağıdır (36).

Bakteriler çoğunlukla yabancı DNA'ları degrade etmek için restriksiyon ve modifikasyon sistemlerini kullanırlar. Bu savunma mekanizması *H. pylori* de iyi gelişmiştir. On bir tane restriksiyon-modifikasyon sistemi tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile bu sistemlerin endonükleaz, metil-transferaz ve özgül subüniteler ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bu tanımlanmış sistemlere ek olarak; yedi tane adenin- spesifik ve dört tane sitosin-spesifik metil-transferaz ve bir tane de henüz bilinmeyen molekül bulunmuştur (36).



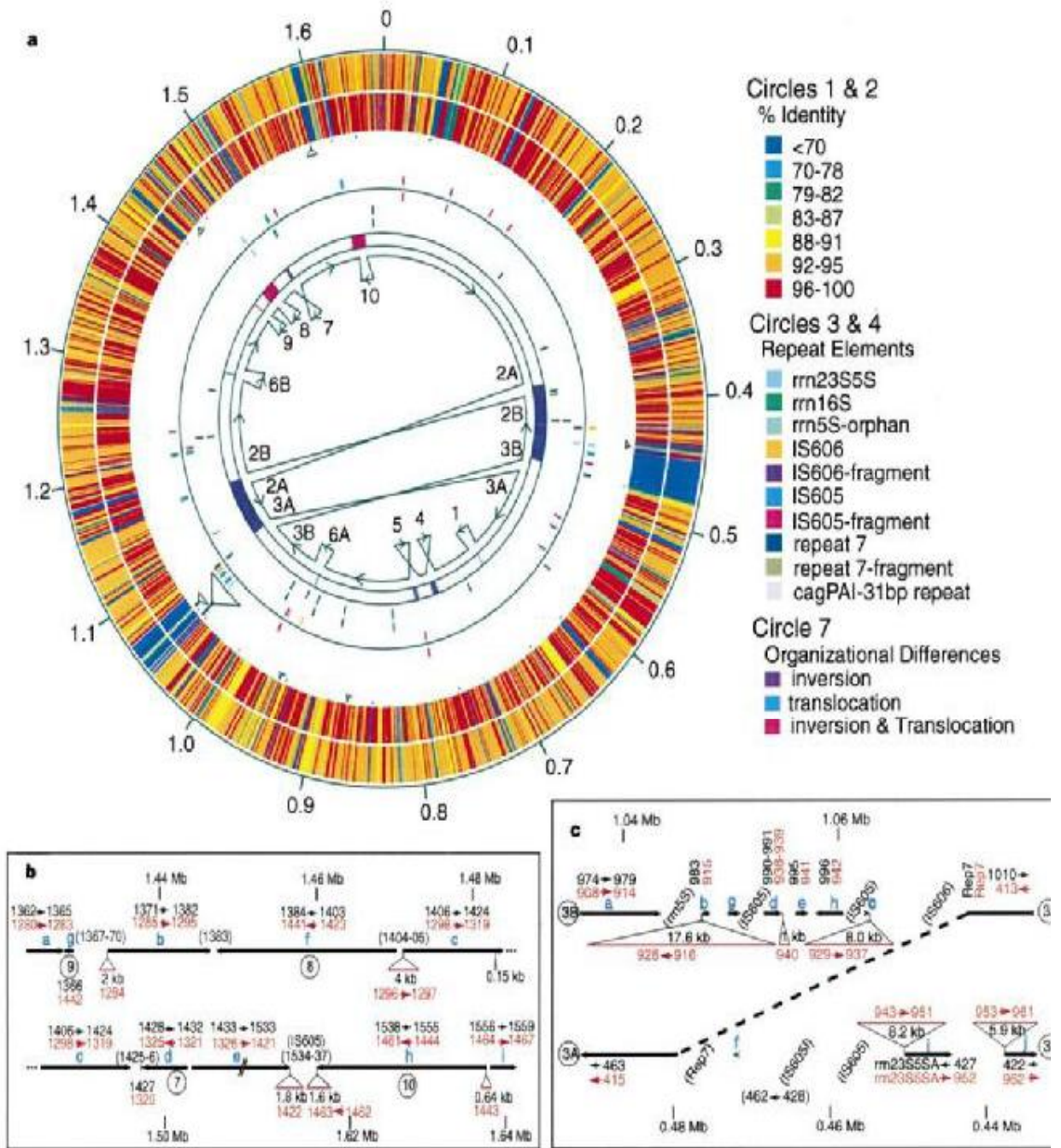
Şekil 2. *Helicobacter pylori* 26695 ve NCTC 11638 standart suşlarının *cag*PAI bölgelerinin karşılaştırmalı görünümü. NCTC 11638 PAI'si *cagI* ve *cagII* olmak üzere iki IS605 elementi içinde bölünmüştür.

*36'ncı kaynaktan alınmıştır.



Şekil 3. *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunun dairesel genomunun görünümü

* 36'ncı kaynaktan alınmıştır



Şekil 4. Kromozomal organizasyon temelinde *H. pylori* 26695 ve J99 standart suşlarının genom sekanslarının karşılaştırılması **a.** Genomun geniş görünümü. Dairesel çemberler en dıştaki konsantrik halkadan numaralandırılmaya başlanmıştır. Dairesel çember 1, nükleotid ve dairesele çember 2, herbir J99 ve 26695 ortoloğu arasında benzer aminoasidde sahiptir. Rölatif yerleşim ve her bir J99-spesifik sekans miktarı hemen ikinci dairesele çember içerisinde gösterilmiştir. en geniş J99-spesifik bölge 150 bp'lık iki ayrı segmentten oluşmuştur (**b**). Dairesel çember 3 (26695) ve 4 (J99) rRNA lokalizasyonu, insersiyon sekansı (IS)

ve tekrar elementlerini göstermektedir. Dairesel çember 5(26695) ve 6 (J99) *NotI* bölgelerinin lokalizasyonunu gösterir. Dairesel çember 7 26695 ortoloğları ile karşılaştırıldığında J99 genlerinin relatif transkripsiyonel yönünü gösterir. Renksiz olan bölgeler ve translokasyonlar J99 ve 26695'te aynı relatif yönde transkribe edilir. Genlerde inversiyon sonuçları J99'da zıt relatif yönde transkribe edilir. Dairesel çember 8, 26695 genomu yerine J99 genom organizasyonunu gösterir. Gereksinilen inversiyonlar ve/veya translokasyonlar J99 için ardarda numaralandırılmıştır. **b**, **c**, **a**'daki daireel çember 8'de görülen 7-10 (**b**) ve 3A/3B (**c**) kompleks organizasyonel farklılıklara geniş bir bakış. 26695 ORF'leri buldukları lokalizasyon ve sırada gösterilmiştir (siyah numaralar). J99 ORF'leri kırmızı numaralar ile gösterilmiştir. Parantez içindeki ORF'ler ve diğer elementler 26695'te bulunur, ancak J99'da bulunmaz. 26695 ile >%90'ın üzerinde benzerlik gösteren J99 segmentlerinin organizasyonu koyu siyah çizgi ile belirtilmiştir. Çerçeveye alınan numaralar **a**'da belirtilen inversiyonlar/translokasyonları gösterir. **a**'daki bölgelerin boyutu megabaz (Mb) olarak gösterilmektedir.

*51'inci kaynaktan alınmıştır.

iv. Üreme Özellikleri

H. pylori'nin üremesi için gerekli olan koşullar; %2-5 O₂, %5-10 CO₂ seviyesi ve yüksek nemdir. H₂ ihtiyacı yoktur ancak *H. pylori* üremesi için de zarar verici değildir. %85 N₂, %10 CO₂, ve %5 O₂'den oluşan standart mikroaerofilik ortamda ve üreme sıcaklığı 34-40°C, optimum 37 °C'de üreme gözlenir (6,8). Enkübasyon süresi maksimum 7-10 gündür (28). Pozitif olan kültürler 3-5 günlük enkübasyon süresinden sonra sonuç verilebilir (8). Doğal habitatı asidik ortam olmasına rağmen, *H. pylori* etrafında oluşturduğu nötrofilik bulut sayesinde canlı kalır. *H. pylori* pH < 4'den kadar yaşayabilir, ancak üremesi için pH aralığı 5.5-8.0'dır (6).

H. pylori kültürü için seçici ve seçici olmayan besiyerleri kullanılmakta ve zenginleştirilmiş besiyeri ortamlarının kullanılması üremeyi artırır. Genellikle lizis olmuş at veya koyun kanı veya alternatif olarak yeni doğmuş veya fetal calf serum (FCS) içeren Columbia veya Brucella agar kullanılır. Genellikle vankomisin, trimethoprim, sefsulodin ve amfoterisin B içeren DENT supplementi ayrıca vankomisin, trimethoprim, polimiksin B ve amfoterisin B içeren Skirrow supplementi de kullanılmaktadır. Sıvı besiyeri olarak genellikle %2-10 calf serum veya %0.2-1.0 β-siklodekstrin içeren Brucella, Mueller-Hinton veya Beyin-kalp infüzyon (BHI) broth kullanılır (6).

Diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek için besiyerine antimikrobikalleri içeren katkıları eklenmektedir. Vankomisin ya da teikoplanin Gram pozitif kokları; polimiksin

B, nalidiksik asit, kolistin, trimethoprim ya da sefsulodin Gram negatif basilleri ve nistatin ya da Amfoterisin B'nin fungusları inhibe etmek amacı ile kullanıldıkları bildirilmektedir (27). β -siklodekstrin veya IsovitaleX, aktif kömür, tam kan, serum, maya ekstrakt, liziz olmuş insan eritrositi, hemin ve kolesterol gibi ortam supplementlerinin sıvı besiyeri için kullanılması önerilmektedir (6,52). Ancak bakterinin sıvı besiyerinde üremesinde inokule edilen bakteri konsantrasyonunun ve suş farklılıklarının da rolü vardır (52).

4.4. Epidemiyoloji ve Prevalans

Dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde *H. pylori* enfeksiyonu epidemiyolojisine genel yaklaşım; dünyayı gelişmiş (düşük prevalans) ve gelişmekte olan (yüksek prevalans) ülkeler olarak ikiye ayrılmaktadır. Bununla birlikte; bu ayırım birçok gelişmekte olan ülkelerdeki alt popülasyonların sosyoekonomik seviyelerinin hızla yükselmesinden dolayı *H. pylori* epidemiyolojisinin anlaşılmasını daha da zorlaştırmıştır (53). On iki gelişmiş ülkede yetişkinler için serokonversiyon oranları 0.3-2.7 olarak ve 11 gelişmiş ülkede ise serokonversiyon oranları 0-1.1 olarak bildirilmiştir (54).

H. pylori için tek konak insandır ve bulaş yolu henüz daha tam olarak bilinmemektedir. İnsan midesi *H. pylori* için rezervuar olarak düşünülmekte ve bulaş yolları olarak; 1- gelişmekte olan ülkelerde fekal-oral yol ile; 2-gelişmiş ülkelerde ise suyun taşıyıcılığı ile gastro-oral yol ile bulaş olduğu kabul edilmektedir. Ancak, kültür değil sadece moleküler metodlar ile suda *H. pylori* saptanması bildirilmiştir. Quralt ve Araujo ve ark. *H. pylori*'nin kültür, morfoloji ve moleküler metodlar ile suda var olduğunu ancak kültür özelliğini ve basil morfolojisini hızlı bir şekilde kaybetmesine karşın uzun süre canlı olarak kaldığını ve DNA'sının saptanabilir düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (13). *H. pylori* kültürü kusmuk, diyareli dışkı ve tükürükten yapılabilmektedir ve bu yollardan bulaş olabileceği düşünülmektedir (13).

Sağlık koşullarının bozuk olduğu durumlarda enfekte ve enfekte olmayan kişileri bir araya getiren herhangi bir aktivitenin *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansının yükselmesine neden olduğunu gösteren çalışmalar enfeksiyonun bulaşıcılığını vurgulamaktadır. Çocukluk çağında kalabalık koşullarda yaşamının enfeksiyonun edinilme riski ile epidemiyolojik bir bağlantısı olduğu gösterilmiştir (30). Ancak buna rağmen yaş ile birlikte *H. pylori* prevalansındaki artış "doğumsal kohort etkisi", sürekli maruz kalma, düşük düzeyde de olsa

erişkin çağında kazanılan enfeksiyon ile açıklanabilir. Doğumsal kohort etkisi; sözkonusu erişkin popülasyonun çocukken enfekte olduğu zaman dilimindeki daha yüksek bulaş oranını yansıtmaktadır. Yaşla birlikte artışı en iyi bu görüş açıklamaktadır (55).

Fujimoto ve ark. Japonya'nın üç farklı bölgesinde yaşayan sağlıklı çocuklar ve yetişkinler arasında *H. pylori* prevalansının 1993'de %68.4'den 2002'de %52.5'e ($p<0.01$) azaldığını bildirmişlerdir. Annesi *H. pylori* negatif çocukların (%3.2) *H. pylori* pozitif annesi olan çocuklara karşı (%21.6) *H. pylori* seroprevalansının daha yüksek olduğu da belirtilmiştir (56). Öğrenciler ve öğretmenler arasındaki seroprevalans aynı yaştaki insanların oluşturduğu popülasyonlar ile karşılaştırıldığında *H. pylori* prevalansının yüksek olmadığı gösterilmiştir. Lynn ve ark.'nın Alaska'da yaşayan yerli olmayan öğretmenlerde seropozitiflik oranının % 24 olduğunu bildirmişlerdir (57). Yaşları 1-82 olan 309 (185 erkek) Türk hastanın *H. pylori* IgG antikör seroprevalansının 1-9 yaşları arasında %42'ye; 60-69 yaşları arasında %100'e arttığı ve 70 yaş üzerinde ise %80'lere düştüğü bildirilmiştir ve bunun sosyoekonomik ve evlilik durumları ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (58).

Sağlıklı insanlar arasında *H. pylori* prevalansının çeşitli seviyelerde olduğu gösterilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* prevalansının yüksek olmasının yaşın ilerlemesi, düşük sosyoekonomik durum, hijyen sorunu, kırsal bölgeler ve doğum ile ilişkili olduğu bilinmektedir. En önemli sonuç ise; *H. pylori* prevalansının çocuklar arasında artış göstermesidir (53).

4.5. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Patogenez

H. pylori enfeksiyonu klinik sonuçları hem konak hem de bakteriyel faktörlere bağlıdır. *H. pylori* majör kolonizasyon bölgesi olan gastrik mukus tabakasında kalıcı, devamlı enfeksiyonlara neden olur. *H. pylori* bir kez yerleştikten sonra, konağın yaşamı boyunca gastrik mukozada yıllarca kalabilir çünkü konağın immunolojik savunma mekanizması *H. pylori*'yi ortadan kaldırmada başarısızdır (59).

Mide lümeni asidik bir pH'ya sahiptir. *H. pylori* burada ancak birkaç dakika yaşayabilir ve en kısa sürede yaşayabileceği pH'ya sahip olan mukus tabakasına ulaşmalıdır (59). Flajelleri ile sağladığı yüksek hareket özelliği, kemotaksis ve üreaz enzimi sayesinde mukus tabakasına ulaşır. Sülfatlanmış polisakaritlerden oluşan mukus tabakası mide asidinden

protonların difüzyonuna olanak tanımakta ve tampon görevi ile mukozal hücreleri mide asidinden korumaktadır (17).

Kemotaksi, gastrik mukozadaki hücreler tarafından salgılanan karbonat ve üre sayesinde gerçekleşir. Üreaz enzimi sayesinde bu üreyi parçalayarak amonyak oluşturur ve bu amonyak bulutu içerisinde kendi yaşayabileceği pH'da bulunur (17). *H. pylori*'nin *in vivo* kolonizasyonu için gerekli olan hidrogenaz ve üreaz enzimleri temel virulans faktörleri arasında yer alır. Üreaz enziminin yapısal alt birimleri UreA ve UreB'dir (60). Üreazın enzimatik aktivitesi asidik pH yanıtında bakteriyel hücreye ürenin girişini regüle eden iç membran pH bağımlı UreI kanalıyla kontrol edilir. Üreaz'ın ilk kolonizasyon aşamasındaki rolü ve önemi hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar sonucunda; üreaz-negatif mutant suşların kolonize olamadıkları ve ülserle neden olmadıkları gösterilmiştir (61). α - β karbonik anhidraz çinko içeren bir metalloenzimdir. Karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü katalizler. *H. pylori*'nin çevreye adaptasyonunda önemlidir (62). Ayrıca *H. pylori* ökaryotik üre döngüsünün anahtar komponentlerinin bazılarını (arginaz RocF) eksprese edebilir. Bu enzimde L-argininin L- ornitine ve üreye parçalanmasını indükler. Bu enzimde mutasyon olması üreaz aktivitesini etkilemediği halde *H. pylori*'nin aside direncini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (6). Mide içerisine doğru sürekli eski mukus tabakaları atılımı söz konusu iken, *H. pylori*'de buna zıt yönde epitel hücrelere ulaşmaya çalışmakta ve tirbüşon benzeri hızlı hareketiyle yeni tabakalara tutunabilmektedir. Epitel hücreye ulaştığında tutunabilmesi için dış membran proteinleri ve diğer faktörler rol oynar. Gastrik epitelde inflamasyon submukozal doku içinde PNL ve diğer immun hücrelerin infiltrasyonunun sonucudur. *H. pylori* de üreaz, VacA ve HP-NAP inflamatuvar moleküllerdendir. Kolonizasyonundan sonra kronik aktif gastritte, intragastrik dağılım ve kronik inflamatuvar yanıtın şiddeti kolonize olan *H. pylori* suşuna, konak genetik ve immun yanıtına, diyete ve mide asiti düzeyine bağlıdır (17).

4.5.1. *Helicobacter pylori* ve Virulans Faktörleri

H. pylori virulans faktörleri kriterleri;

- (1) Virulans faktörünün hastalık veya diğer *in vivo* şartlar ile korelasyonu
- (2) Populasyon ve bölgeler arasında epidemiyolojik tutarlılık olmalıdır

(3) Biyolojik olasılık olmalıdır

(a) Biyolojik aktivite gen delesyonu ile azalmalı veya elimine olmalıdır

(4) Biyolojik aktivite tamamlayıcısı (complementary) ile onarılmalıdır (50).

Birçok *H. pylori* kolaylıkla yabancı DNA'yı içine alarak, teknik olarak kolay ve uygulanabilir şekilde genleri nakavt yapar; dikkat edilmesi gereken nokta basit gen delesyonları ile ilgili genlerin nakavt edilmesi değil downstream genlerin regülasyonunun bozulması ile nakavt etkisinin oluşmasıdır. Virulans faktörlerinin çok az bir kısmının peptik ülser ve gastrik kanser gibi klinik sonuçlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Tablo 1) (50).

Tablo 1. *Helicobacter pylori* virülans faktörleri

Önemli virülans faktörleri / genler	Hastalık oluşumu ile ilişki	Farklı bölge ve populasyonlarda görülen ilişki	Biyolojik olarak uygun ilişki	Virülans faktör
AlpAB	Hayır	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
BabA	Evet	Olası	Evet	Olabilir
CagA	Evet	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Olabilir
cagPAI	Evet	Evet	Evet	Evet
dupA	Evet	Evet	Evet	Evet
hrgA	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
iceA	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
jhp0947-jhp0949	Evet	Hayır	Hayır	Bilinmiyor
LPS	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
NapA	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
OipA	Evet	Evet	Evet	Evet
SabA	Hayır	Hayır	Evet	Bilinmiyor
VacA	Evet	Hayır	Evet	Hayır

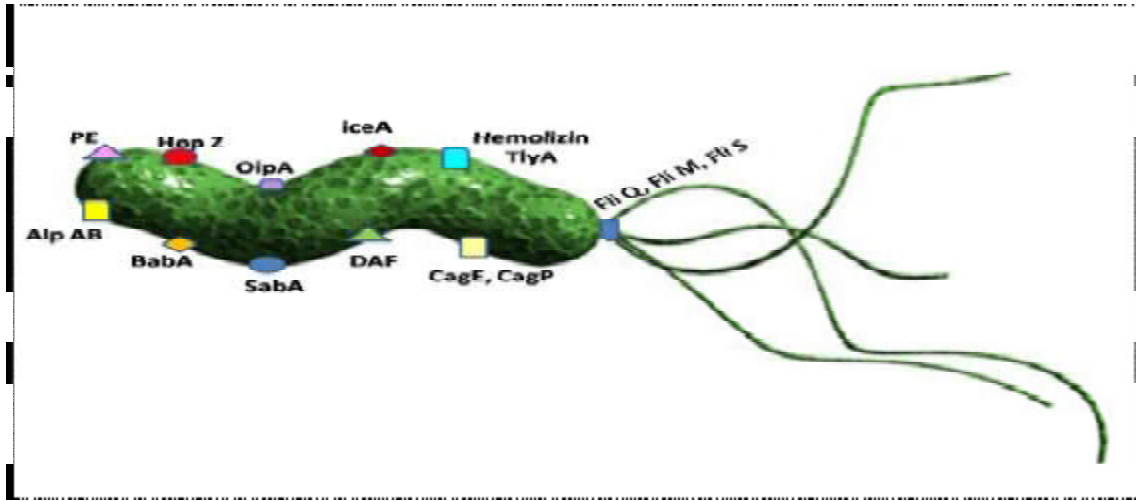
AlpAB, adherence-associated lipoprotein; BabA, blood-group antigen binding adhesions; CagA, cytotoxin-associated gene A; cag PAI, cag Pathogenicity island; OipA, Outer inflammatory protein; dupA, duodenal-ulcer promoting gene; hrgA, analog of Mbol restriction-modification system of *Moraxella bovis*; iceA, induced by contact with epithelium; jhp0947-jhp0949, *H. pylori* genes in the plasticity region; LPS, lipopolisaccharide; NapA, neutrophil-activating protein; SabA, sialic acid-binding adhesins; VacA, vacuolating cytotoxin A.

* 50'inci kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.1. Adezyon Molekülleri

H. pylori'nin adezyon molekülleri ile gastrik mukozaya aderansı, insan gastrik mukozasında uzun süreli kalıcı kalmasında ve başlangıç kolonizasyonunda önemlidir. Genom analizleri tamamlanmış olan standart *H. pylori* suşları (26695, J99, HPAG1) ile yapılan çalışmalar sonucunda *H. pylori* genomunun yaklaşık %4'ünü oluşturan beş ana OMP'leri bildirilmiştir. *H. pylori*'de bu aileler içerisinde OMP üyeleri arasında ilk karakterize edilen büyük bir üyesi olan *Helicobacter* dış membran proteinleridir (Hop). Hop ailesi içerisinde, bazı OMP'leri; kan grubu antijen bağlayan adezin (blood group antigen binding adhesin) (BabA), sialik asit bağlayan adezin (sialic acid binding adhesin) (SabA), aderans ile ilişkili protein (adherence-associated lipoprotein) (AlpA ve AlpB), dış membran inflamatuvar protein (outer membrane inflammatory protein) (OipA) ve HopZ adezyon molekülleridir (63,64).

Fukosillenmiş ABO kan grup antijenleri ve siyalil-Lewis x (sLe^x) ve siyalil-Lewis a (sLe^a) antijenleri *H. pylori* aderansında fonksiyonel reseptörlerdir. Bu reseptörler ABO antijenleri ile ilişkili ve lewis b antijenine (Le^b) bağlanan BabA ve sLe^a SabA tarafından tanınır (63). AlpAB, OipA ve HopZ için reseptörler henüz daha bilinmemektedir (63).



Şekil 5. *Helicobacter pylori* kolonizasyonu ve aderansında rol alan virulans faktörleri. PE: Fosfatidiletanolamin; HopZ; OipA: outer membrane inflammatory protein; iceA: induced by contact with the epithelium; Hemolizin; TlyA; Hp1086; Fli Q, Fli M, Fli S; CagE; CagP; DAF: decay-accelerating factor; SabA: sialic acid binding adhesin; BabA; blood group antigen binding adhesine; AlpAB: adherence-associated lipoprotein A.

4.5.1.1.1. Kan Grup Antijen Bağlayan Adezin (BabA)

BabA orijin olarak Le^b antijenine bir adezin bağlayıcı olarak tanımlanmaktadır. H-1 antijeni ABO kan grup sistemlerinden O fenotip kan grubu olarak tanımlanan karbonhidrat yapısıdır. Difikolize olmuş Le^b, H-1 rezidüsü olan fukoz (Fuc) dalının eklenmesiyle oluşmaktadır. A ve B kan grubu olarak tanımlananlar antijen fenotipleridir ve terminal- N-asetilgalaktozamin (GalNAc) ve H-1'in ve Le^b'nin, A-Lewis b (ALe^b), B-Lewis b (BLe^b) antijenlerinin galaktoz alt birimlerini oluşturmaktadırlar (63).

Gastrik mukozada sekretuar pozitif bireylerde Le^b dominantken, sekretuar negatif bireylerde ise Le^a dominant bulunur (63). Sekretuar ve non-sekretuar terimleri kişilerin tükürüklerinde bulunan bazı maddeler gibi salgılanıp salgılanamama kapasitelerini belirtir. Sekretuar pozitif bireyler tükürükte ABH, Le^b, Lewis y (Le^y) sekretuar negatif bireyler ise Le^a, Le^x antijeni salgırlar (63, 65).

H. pylori 26695, J99 ve HPAG1 suşlarının her biri bir *babA* alleli (HP1243/JHP0833/HPAG1_0876) ve bir *babB* alleleline (HP0896/JHP1164/HPAG1_0320) sahiptir. Bu üç suş arasında *babA* ve *babB* genlerinin genomik lokasyonları farklıdır. J99 suşunda, *babA* J99 spesifik gen (JHP0833) ile *hypD* (JHP1165)'nin downstream bölgesi arasındadır, ve *babB* (JHP1164) ise *sI8* (JHP1165) downstream'inde bulunur. 26695 suşunda; *babA* (HP1243) ve *babB* (HP0317)'nin lokalizasyonu terstir. *hypD* ve *sI8*'in downstream kromozomal lokalizasyonu sırası ile lokus A ve lokus B olarak tanımlanır. 26695 suşunda, fonksiyonu bilinmeyen *babA* ve *babB* homolog OMPs kodlayan bir gen *babC* (HP0317) identifiye edilmiş ve lokalizasyon bölgesi lokus C olarak tanımlanmıştır. HPAG1 suşunda *babB* geni lokus C'de ve *babC* geni ise lokus B'de lokalize olduğu bildirilmiştir. Gen aktivasyonu çalışmaları sadece bir genin (*babA2*) Le^b antijen-bağlama aktivitesine sahipken diğer genin (*babA1*) sahip olmadığını ve *babA1*'in lokus B'de lokalize olduğu *babA2* lokusunun ise henüz daha belirlenemediği bildirilmiştir (63). *H. pylori* J99 suşunda BabA'nın eksprese edildiği ve Le^b antijenine bağlandığı; *H. pylori* 26695 suşunda ise BabA saptanabilecek düzeyde eksprese edildiği fakat Le^b'ye bağlanamadığı bildirilmiştir (66). Ancak Colbeck ve ark. *H. pylori* J99 ve 26695 suşlarının komplementer lokuslarında *babA* ve *babB* içerdiğini *in vitro* RecA bağımlı rekombinasyon çalışması ile göstermişlerdir (64). Üç *bab* alleli vardır: *BabA1*, *BabA2* ve *BabB*, bunlardan yalnızca *BabA2* Le^b'ye bağlanabilmektedir (67). *babA* ve *babB* allelik grupları birbirlerinden bağımsızdırlar ve her

bir allelik grup kendi içinde coğrafik varyasyon gösterir (68). Örneğin, CCUG17875 referans suşu BabA adezini tarafından eksprese edilen *babA2* ve tamamlanmamış sinyal peptidi nedeniyle sessiz olan *babA1* olmak üzere iki *babA* geni içermektedir. *babB* geni 5' ve 3' ucunda *babA* ile yüksek homoloji gösterirken reseptör bağlanmasının spesifikliğini belirleyen *babA* merkez bölgesi ile homoloji göstermez (63,69). Colbeck ve ark. *H. pylori* suşu J166 ile enfekte Rhesus macaques'da *H. pylori*'de gen konversiyonu gözlemişlerdir. İnoküle edilmiş J166 suşunda J99 gibi aynı kromozom lokusunda *babA* ve *babB* içermektedir fakat enfeksiyon sonrasında tekrardan izole edilen suşların çoğunda *babB*'nin ikinci bir kopyası ile *babA* yer değiştirmektedir. Enfeksiyon sonrası izole edilen bu suşların bir kısmında *babA*'nın eksprese edilmeme nedeni olarak 5' sinyal peptit sekansında sistein-treonin (CT) dinükleotid tekrarının sayısındaki değişiklik olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç, bazı insan suşlarında *babA* olmamasının kanıtı olabilir ve bu rekombinasyonların maymunlarda selektif baskı yanıtını oluşturabileceği gibi aynı yanıtın insanlardan izole edilen *H. pylori* klinik izolatlarda da görülebileceğidir. Faz varyasyonuna izin veren CT dinükleotid tekrarları özellikle *babB* ve *babB* lokusunda bulunduğu zaman *babA*'da 5' kodlama bölgesinde sık olarak gözlenmektedir (64). *BabA2*'nin ülser ve gastrik karsinoma için yüksek risk oluşturduğu ve *vacAs1* ve *cagA* genotipiyle güçlü ilişkisi olduğu gösterilmiştir (67). *babB*'ninde içinde bulunduğu *hop* genleri frameshift mutasyonlarına eğimlidirler ve *hop* gen ekspresyon bölgesinde tekrarlayan sekans motifi içerirler. *bab* geni; iki *babA* ve bir *babB* geni içeren CCUG17875 suşundan klonlanmıştır. *babA* genleri sessiz *babA1* geni ve *babA2* geni eksprese eden CCUG17875 suşundan klonlanmıştır. Bu iki genin sekans sonuçlarındaki tek fark translasyonel başlangıç kodu olan 10 bp'lık sinyal peptit sekansının *babA1*'de elimine olmasıdır (63). *H. pylori* suşları ile ilişkili birçok hastalıkta BabA adezini eksprese edilir (69).

H. pylori ile enfekte hücreler tarafından üretilen inflamatuvar yanıtlar ve efektör moleküller, enfeksiyon esnasında lokal gastrik çevredeki değişikliklere neden olurlar. *H. pylori*'nin yaşamını sürdürebilmek için bu değişikliklere adapte olması gerekmektedir. *H. pylori* populasyonunda yüksek genetik çeşitlilik ve suşlar arasında ve suşlar içinde yüksek düzey rekombinasyon gözlenmektedir. Bu genetik çeşitlilik bakteriyal fenotip heterojenliğini açıklamaktadır ve herhangi bir bakteriyal ırkın subklonları persistan enfeksiyonun akut ve kronik fazında mukozal glikolizasyon paternindeki değişiklikler gibi konak çevredeki değişikliklere adapte olabilmektedir (69).

Gastrik mukozayı kaplayan mukus jel tabakasını oluşturan gastrik mukoza hücreleri müsin salgılar (63). Sağlıklı midede yüzey epitellerden ve glandlerden MUC5AC müsinini sadece glandlerden MUC6 müsinini üretilir (63,70,71). *H. pylori* enfeksiyonunda MUC2 ve MUC5B gibi diğer müsinler salgılanabilir. Müsinlerin moleküler ağırlığının %50'den fazlasını karbohidratlar oluşturur ve her bir müsin 100 farklı oligosakkarit yapı taşıyabilir. Karbohidrat yapılar hücre yüzeyini kaplar ve patojenik mikroorganizmalar için reseptördür ve salgılanan müsinine bağlandığında patojen mikroorganizma için tuzak reseptörler gibi rol oynar. Müsin ekspresyon profili dokular arasında değişiklik gösterir. Oral kavitede MUC5B ve MUC7 major salgılanan müsinlerdir ve mukus polimer matriksinin müsin benzeri tükürük aglütininin komponenti ile birlikte bulunur. Tükürük müsinleri hem sülfatlanmış hemde sialillenmiş durumdadır, ancak sağlıklı midenin gastrik müsinleri çok düşük düzeyde bu yapıları eksprese eder. Hastalıkta hem sülfatlanmış hemde sialillenmiş yapılar midede görülür. *H. pylori* sağlıklı bireylerde nötral pH'da insan gastrik MUC5AC'ye bağlanan *H. pylori* konak müsininde bulunan Le^b ve bakterideki BabA'ya bağlanırken; *H. pylori* ile enfekte gastrik dokuya bağlanmasında konak dokudaki sLe^x ve bakterideki SabA ile etkisini gösterir (37). *H. pylori*, gastrik *H. pylori* enfeksiyonu olan ve olmayan kişilerde oral kavitede saptanmış, midelerinde ve tükürüklerinde birden fazla suşun aynı anda bulunabileceği bildirilmiştir. Oral kavitenin rezervuar ve giriş kapısı olabileceği düşünülmektedir. *H. pylori*'ye karşı korumada tükürük ve mukus önemli rol oynar. Tükürük miktarı azalması ve ekzokrin bezlerin otoimmün parçalanmasının gözlemlendiği primer Sjögren Sendromunda (SS) *H. pylori* prevalansında artış bildirilmiştir (70).

Protein üretimi *BabB* geninin 5' ucunda CT dinükleotid tekrarları sayısına bağlı olarak switch on-fonksiyonel, switch off- nonfonksiyonel faz varyasyonu ile gerçekleşir (63,64). Backström ve ark. Le^b bağlanamayan suşların genellikle *babB* lokusu içine rekombinasyonu ile aktive olabilen sessiz *babA* gen sekanslarını bildirmişlerdir ve çoğu suş Le^b'ye ek olarak A-Le^b ve B-Le^b'ye bağlanabilen "generalist" suş olduğu halde özellikle Güney Amerika Kızılderilileri arasında predominant birkaç suşun ise sadece Le^b'ye bağlanabilen "specialist" suş olduğunu göstermişlerdir (69).

BabA ekspresyonunun transkripsiyon ve translasyon seviyelerini içeren regülasyonu için çeşitli mekanizmalar bildirilmektedir. Translasyonel regülasyon da proteinlerin kimerik oluşumunun önemli rol oynadığı bilinmektedir (63). Kimera oluşumunu 42 *H. pylori* klinik

izolatlarının iki (%5)'sinde 5' bölgesinde *babB*'nin 56 bp'lik *babA* geni (*babA/B* kimera) ile yer değiştirdiğini; *H. pylori*'de gen konversiyonu sıklığını (10^{-3}) ve bu durumun *recA* bağımlı ve DNaz direnci sonucu intragenomik rekombinasyonu gösterdiği ve de *babA/B* kimeraları *H. pylori* enfeksiyonlu Rhesus maymunlarında da bildirilmiştir (63).

Klonlanmış CCUG17875 suşunda *babA1* yerine *babA2*'nin transkribe edildiğini ve *babA* transkripsiyonunun *babA* promotorunun -10 ve -35 bölgesi içerisinde bulunan adenin [poly (A)] nükleotidleri sayısı ile regüle edildiğini bildirmişlerdir. *babA2* sekansındaki -10 ve -35 bölgesi *E.coli* σ^{70} promotoru ile yüksek homoloji gösterir. Bu bölgenin adenin sayısı 10 (*babA2*) ise kararlı fakat adenin sayısı 14 (*babA1*) ise fonksiyonunu kaybettiği gösterilmiştir (63).

4.5.1.1.2. Sialik Asit Bağlayan Adezin (SabA)(HP0725)

H. pylori'nin alyuvara bağlanmasını düzenleyen bakteriyal yüzey proteindir ve *H. pylori*'nin konak aderansı için fonksiyonel reseptördür (71). *H. pylori* sialik-asit bağlanan proteinlerden iki tane tanımlanmıştır; sialik asit bağlayan protein SabA ve NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc-bağlayan nötrofil aktive eden protein HP-NAP. SabA, *H. pylori* bakteri hücrelerinin gangliositlere bağlanmasından sorumlu olan tek faktördür. *H. pylori* bağlanan gangliositlerden bazıları insan nötrofillerinde de bulunur. Sialillenmiş Le^x ve Le^a benzeri glikanlar ile bağlanmasında kullanılan epitop NeuAc α 2-3Gal olarak karakterize edilmiştir. *H. pylori* NAP sialik asit bağlama özelliği göstermektedir (72).

Sağlıklı midede bulunan müssinlere SabA'nın bağlanmadığı saptanmıştır ve *H. pylori* ile enfekte gastritli bireylerdeki gastrik müssine bağlanma düşük miktardadır (70). İnsan benzeri rhesus maymun modelinde bütün enfekte hayvanlarda *H. pylori* enfeksiyonunun birinci haftası içerisinde sialillenmiş Lewis antijenlerinde güçlü bir artış gözlenmektedir fakat bu önemli değişikliğin kronik enfeksiyonunun 10'uncu haftası içerisinde inokulasyondan önceki düzeye geri döndüğü gözlenmiştir. Bu adezinin kronik enfeksiyon erken tanısında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (70).

Gangliosidlere ve ekstrasellüler matrix proteini laminine bağlanma ile ilişkilidir (6,73). SabA genin 5' bölgesinde yer alan CT tekrarlayan motif içerisinde "kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması" ile regüle edildiği bildirilmektedir. SabA ekspresyonu pH 5'te azalır ve intestinal metaplazi ve gastrik atrofide yükselir. SabA membran

bağlanmasında görevli sialil-di-Le^{x/a} glikosfingolipidlere bağlanma ile selektin mimikrisi yapar. SabA “on”, HopZ “off” ve *iceA1* (induced by contact with the epitelium) alleli mevcut olduğu durumda MALT lenfoma riski artışı bildirilmiştir (73). SabA bulunmayan mutant ve wild-tip (*wt* suşlar) suşlarda nötrofil aktivite kapasitesi yoktur ve *H. pylori*'nin bağlandığı sialillenmiş nötrofil reseptörlerinin; bakterinin aderansı, fagositozu ve oksidatif patlamanın indüklenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Unemo ve ark. SabA adezinlerinin insan nötrofillerinin opsonik olmayan aktivasyonunda reseptör bağlayıcı ve oksidatif patlama arasındaki bağlantının G protein bağlayıcı sinyal yolağı ve fosfatidilinositol-3 kinazın downstream aktivasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (72).

sabB geni SabB proteinini kodlar. SabB hakkında az bilgi olmasına rağmen, SabA'nın homologudur (74). SabA ya da SabB eksprese edilmediği “switch off” durumlarda aderans, kolonizasyon yeteneği, bakteriyal dansite ve enflamasyonun indüklenmesinin azaldığı bildirilmiştir (75). de Jonge ve ark. Hollandalı hastalarda *sabA*'nın değil, *sabB* geninin kapalı olduğu, eksprese edilmediğinde “switch off” da gastrik ülserle değil duodonal ülser ile ilişkili ve hastalık seyrinde bir belirleyici olduğu bildirilmiştir (74). Doksan altı hastada (dokuz gastrik kanser, 28 duodonal ülser, 21 gastrik ülser, dokuz lenfoma, 29 gastrit) 7±3 CT tekrarının SabA veya SabB eksprese edildiği “switch on” statüsü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (69,73).

4.5.1.1.3. Dış Membran İnflamatuvar Proteini (OipA) (HopH) (HP0638)

Bütün *H. pylori* suşlarında bulunmakta fakat ekspresyonunda suşlar arası varyasyon bildirilmektedir (76). Gastrik epitel hücelere bağlanmada rol oynayan spesifik reseptörler henüz tanımlanmamıştır. OipA'nın 5' ucunda “kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması” ve çerçeve kayması mutasyonları olmaktadır (16,77). Gastrik epitel hücrelerde interlökin 8 (IL-8) üretimini stimüle edicidir (16,78). IL-8 üretimine etkisinin yanı sıra interlökin 6 (IL-6), RANTES ve metalloproteinaz 1 (MMP-1) üretiminde rol oynar (78). OipA'nın fonksiyonu hala daha tam olarak bilinmemekle birlikte, OipA'nın ekspresyonunun *cagPAI*, *VacAs1* ve *BabA2* virulans faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (23,76,79). *babA* ve *oipA* eksprese eden *H. pylori*'nin mukozal hücre enflamasyonu ile ilişkili olduğu, peptik ülser ve gastrik kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir (73).

hopH mutant suşları wild-tip (*wt* suşlar) suşlara göre gastrik epitel hücreye daha düşük aderans gösterir ve *hopH* geninin komplementasyonu *hopH* mutant *H. pylori*'nin aderans özelliğini tekrar kazandırır (23). *oipA* mutant *cagPAI* pozitif *H. pylori* suşlarının Mongolian gerbillerde kolonizasyon yeteneğini zayıflattığı bildirilmiştir (77).

Bütün *H. pylori* suşlarında *OipA* proteinini kodlayan gen bulunur ancak *sabA*'da olduğu gibi, genin 5' bölgesinde yer alan CT tekrarlayan motifleri "kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması" ile regüle edildiği bildirilmektedir (73,74). *OipA*'da, CT tekrarının duodenal ülser gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (74).

OipA ve *cagA*'nın IL-8 promotorunun aktivasyonu için gerekli olduğu, STAT 1 fosforilasyonu ve interferon regülatör faktör 1 (IRF1) yolağı ile IL-8 sekresyonunu artırdığı bildirilmiştir (6,23,79,80). Gerbillerde *OipA*-negatif suşların gastrik kanseri uyarma yeteneklerinin azaldığı saptanmıştır (80). HP0638'e sahip "switch on" (eksprese eden) Batı suşlarda 6, 5+2 ve 9 CT tekrar paterninin dominant olduğu, HP0638 sahip olup ancak "switch off" (eksprese edilmeyen) olanda ise 7 ve 8 CT tekrar paterni olduğu; Doğu Asya suşlarında ise ≤ 5 CT tekrarı içerdiği bildirilmiştir (68). de Jonge ve ark. *OipA* ekspresyonu ile klinik yaklaşım arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (74).

4.5.1.1.4. Aderans-İlişkili Lipoprotein A (*AlpAB*)

Gastrik kolonizasyon için efektör bir proteindir (81,82). *alpA* ve *alpB* genleri operon bölgesinde bulunurlar ve ko-transkribe edilirler. Bu genlerin parafine gömülü doku kesitlerinde *H. pylori* bağlanmasını bloke eden AlpA füzyon proteinlerine karşı antiserum ile *H. pylori* preinkübasyonunun çalışıldığı deneylerde adezin proteinleri kodladıkları bulunmuştur. *alpAB* veya *alpB*'nin eksprese edilmediği "switch off" durumlarda parafine gömülü dokularda epitel hücreye aderans azaldığı, *alpA* ve *alpB* gen ürünlerinin aderans fenotipinde önemli olduğu bildirilmiştir. Ancak, *in vivo* koşullarda gastrik epitel hücre aderansındaki rolleri bilinmemektedir (83).

AlpA tipik lipoprotein sinyal sekansı, AlpB ise karakteristik standart sinyal sekansı taşır. Konak hücre ile *H. pylori* arasındaki bağlanmada rol alan reseptör tam olarak tanımlanamamıştır (81). AlpAB, enfeksiyonun ilk üç ayında insan gastrik dokusunda *in vivo* transkribe edilir ve enfeksiyonun erken aşamasında rol oynaması nedeniyle profilaktik aşı için önemi düşünülmektedir (82). Lu ve ark. C57B/6 farelerinin midelerinde zayıf kolonize olan

alpA/alpB'den yoksun mutantların hücresel bağışıklıkta gelişmiş olabileceğini ve alt mukozal seviye proinflamatuvar efektörleri olan KC ve IL-6 ile ilişkili olabileceğini *alpA/B* genlerinin delesyonu durumunda AGS (human gastric carcinoma cell line) hücrelerinde Batı suşlarında değil Doğu Asya suşları ile gelişen enfeksiyon da IL-8 uyarımını azalttığını bildirmişlerdir (83).

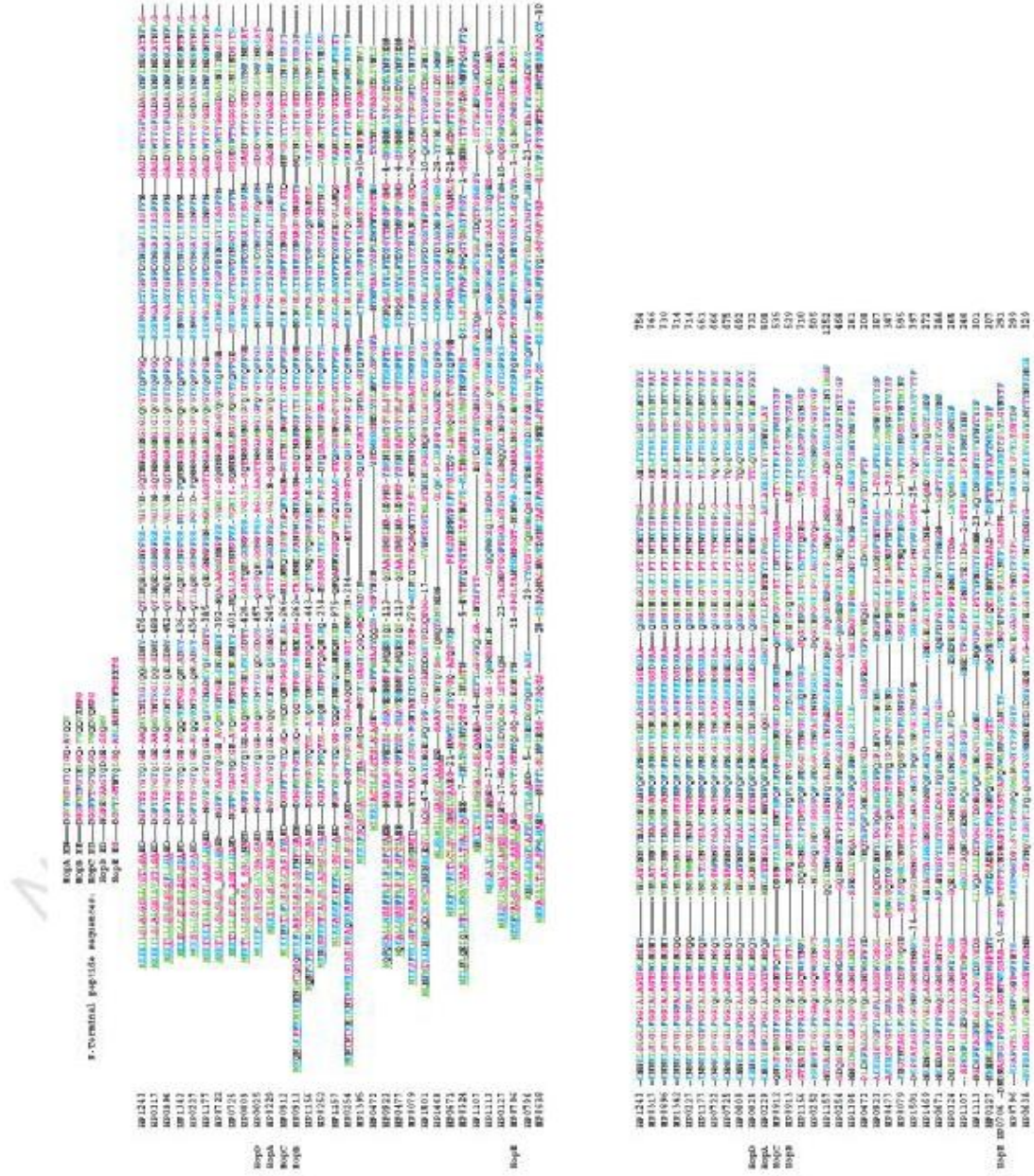
4.5.1.1.5. Epitel Kontakı ile Oluşan Gen A (*iceA*)

H. pylori ve insan epitel hücresi arasında *iceA1* ekspresyonu upregüle olur; *iceA1* ve *iceA2* genin allelik varyantlarıdır. *H. pylori* patogenezinde *iceA1*'in rolü henüz daha tam olarak bilinmemektedir ve genellikle fonksiyonel protein kodlamaz (16). *iceA1* ekspresyonu konak hücre mukozal yanıtı ile ilişkilidir. *iceA2* ekspresyonu tekrarlayan protein yapısında fakat bilinen proteinler ile homolojisi olmayan gen yapısı ile etkileşime girebileceği bildirilmiştir (67). Diğer bakterilerin restriksiyon endonükleaz genleri ile homolojiye sahiptir. Restriksiyon endonükleaz enzimi yabancı bakterilerin DNA'larını parçalayan bir savunma ajanıdır ve genellikle patogenez ile ilişkili değildir (16). Peptik ülser ile ilişkili olan *iceA1* pozitif suşta IL-8 üretimi artmaktadır (67). *iceA1* suşlarının duodenal ülser ve gastrik kanser ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (8,16). Buna karşın, *iceA* geni ile ilişkili hastalıklarda bulgular farklı olabilir. Ancak, *iceA1* ile birlikteliği olan, bütün restriksiyon enzimlerin de bulunan ve restriksiyon enzim aktivitesinden kendi DNA'larını koruyabilmek için spesifik metilaz ile ilişkisi olan metilaz *hpy1M*'nin ekspresyonu önemli olabilir. *H. pylori*'de *iceA2* geninde bulunmayıp *iceA1* geninde bulunan metilaz geni *hpy1M*'nin yüksek ekspresyonuna sahiptir (16). *iceA1* genotipinin *vacA* s1 ve *vacA* m1 allelleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (68).

4.5.1.1.6. Decay Akselere Edici Faktör (DAF) (CD55)

Komplemanın intrinsik regülatörü olan DAF epitel hücreyi kompleman aracılı lizisten koruyan bir protein ve bakteriyal patojenler için reseptördür. Dört sürekli, 60 aminoasit uzunluğunda tekrarlayan kompleman kontrol protein tekrarı (CCP) içeren 70 kDa'luk bir glikoproteindir (84). Glikosilfosfotidilinositol kök ile membrana bağlıdır (78,80). *H. pylori* de reseptör olarak DAF proteini rekombinant hücre modelinde gösterilmiştir. Mikrobiyal gastrik epitel hücre etkileşim modelinde, *H. pylori*'nin DAF ekspresyonunu indüklediği ve knockout farelerde bu etkileşimin başından sonuna kadar kullanıldığı bildirilmiştir (84).

jhp0947-jhp0949 genlerinin (ki bunlar birbirlerine bağlıdır) varlığı, gastrit ile karşılaştırıldığında duodenal ülser ile önemli bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir (50).



Şekil 6. *Helicobacter pylori* dış membran proteini ailesi üyelerinin multiple sekans dizisi. N-terminal peptid sekansı, HopA, HopB, HopC, HopD, HopE (soldan yukarı); HopD, HopA, HopC, HopB, HopE, HopD, HopA, HopC, HopB, HopE (soldan sağa)

* 36'ncı kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.1.7. Diğer Faktörler

Fosfatidiletanolamin (PE) (HpaA) *H. pylori* katalazının PE reseptörüne bağlandığı 19.6 kDa'luk korunmuş bir proteindir ancak adezin olup olmadığı tartışmalıdır (84). **α - β -karbonik anhidrazlar (CA)** çinko içeren bir metalloenzimdir ve karbondioksitin bikarbonata dönüşmesinde rol oynar. Çevreye karşı adaptasyonda önemli olduğu ancak kolonizasyondaki rolü bildirilmemiştir. 26695 suşunda HP004'ü gösteren open-reading frame β -CA tip enzimini kodlar. Bu enzim *E.coli* CynT ile % 30 ve *H. hepaticus*'un β -CA'sı ile % 48.5' lik benzerlik göstermektedir. *H. pylori* 26695 suşu ORF HP1186 tarafından kodlanan α -CA tip enzime sahip bakterilerden biridir ve bu enzim *Neisseria gonorrhoeae*'nin α -CagA'sı ile %24, *H. hepaticus*'un α -CagA'sı ile %28 benzer rezidüel taşımaktadır (62). **Hemolizin TlyA (Hp1086)** por oluşturan sitolizin ortoloğudur ve mutasyon olduğunda aderans ve hemolitik aktivite azalmaktadır. *cagPAI* genlerindeki özellikle ***cagE***, ***cagP*** mutasyonlarında aderansta azalma gözlenmektedir. *cagP*'nin fonksiyonu belli değildir ancak *cagE* IL-8 indüksiyonunu sağlamaktadır. Flajellar biyosentetik protein fonksiyonu gösteren **FliQ** ve **FliS**, flajellar motor switch protein fonksiyonu gösteren **FliM**'de herhangi bir mutasyon olursa aderansta azalma gözlenmektedir (85). **HorB (HP0127) proteini**, *horB* geni tarafından kodlanan diğer bir dış membran proteini ailesi üyesidir; bu genin inaktivasyonu bakteri kolonizasyonunun, farelerde LPS O-zinciri ve Lewis antijenlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (68,86). Benzer şekilde, **tip- α geninin** nakavt yapılması durumunda gastrik fare mukozasına kolonize olan *H. pylori*'lerin azaldığı ve Tip- α 'nın ayrıca IL-1 α ve tümör nekroz faktör (TNF)- α gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salınımını uyardığı saptanmıştır (80). ***hopZ*** genine sahip *H. pylori* suşları gastrik epitel hücreye adere olur. Bu bakteri yüzeyinde HopZ proteinin lokalizasyonu ile koreledir (74). *hopZ* geninin 5' bölgesinde yer alan CT tekrarlayan motif içerisinde "kayan iplik tamir (slipped strand mispair repair) mekanizması" ile regüle edildiği gösterilmiştir (73,74) Ayrıca **HopZ** mutant suşunda gastrik epitele bağlanmanın azaldığı ve gastrik dokuya *H. pylori* tropizmini düzenlediği bildirilmiştir (85). de Jonge ve ark. *hopZ* ekspresyonunun klinik yaklaşım ve *cag PAI* varlığı ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (74).

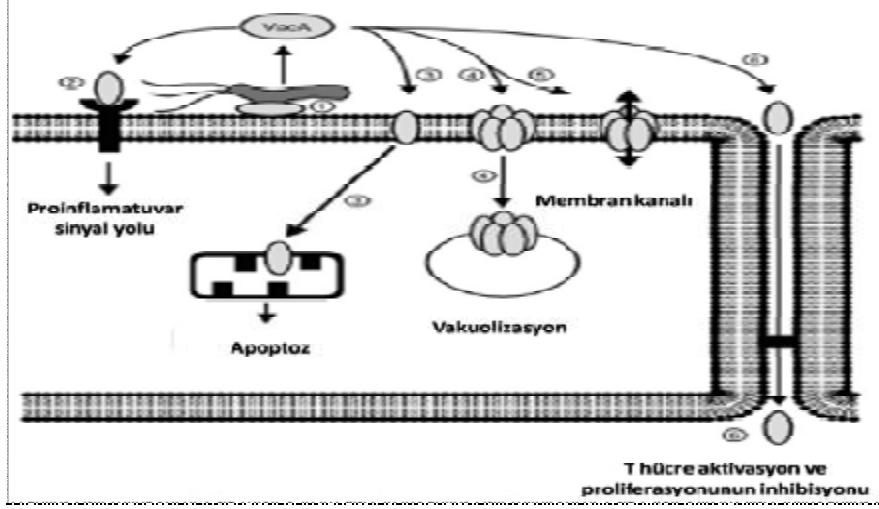
4.5.1.2. Vakuol Oluşturan Sitotoksin A (VacA)

Bütün *H. pylori* suşlarının yaklaşık % 50'si *in vitro* koşullarda epitel hücrelerde vakuolizasyonu uyaran önemli derecede immunojenik olan VacA proteini 140-kDa'luk

protoksine benzer ve salgılandığında 88-kDa olgun forma dönüşür (6,86). Terebiznik ve ark. VacA bağımlı *H. pylori*'nin lizozomal yolağında bakterisidal komponentlerden bakteriyi koruyan, bakterinin hayatta kalmasını destekleyen ve kalıcı enfeksiyon oluşmasında yardımcı bir vakuol içerdiğini bildirmişlerdir (86). Salgılanan VacA toksini (88 kDa) anyon seçici membran kanallarının oluşumu için düzlemsel bilayer yağ tabakalarının iç kısmına yerleşebilmektedir. Bu kanalların oluşumunun sitotoksik aktivite için gerekli olduğu bildirilmiştir (79). VacA hücre membranında por oluşturarak konak hücreden üre ve anyonların salınımını uyarır (Şekil 7) (6). Geisse ve ark. VacA'nın lipit tabakasına etkin bir şekilde bağlanmasında kolestrolün gerekliliğini göstermişlerdir. VacA ayrıca kolestrol, sfingomiyelin ve dioleoilfosfatidilkolinden oluşan iki katmanlı yapı ile etkileşim halindedir ve genellikle sfingomiyelince zengin bölgeleri hedef aldığı bildirilmiştir (87).

vacA geni en az iki değişken bölge içerir. s bölgesi (sinyal peptidi kodlayan bölge) s1 ve s2 allel tipleri ile bir arada bulunur. Alt tipler olan s1a, s1b ve s1c ise s1 tip suşları olarak tanımlanmıştır. m (middle/orta) bölgesi ise m1 veya m2 allel tiplerinden oluşur (45,68). Genellikle, s1/m1 ve s1/m2 tiplerini içeren suşlar sırasıyla yüksek ve orta seviyede toksin üretirler (45) Birçok *vacA* s1 suşu *cagA* pozitif ve birçok *vacA* s2 suşu ise *cagA* negatiftir (68). *vacA* s1- ve *cagA*-pozitif genotiplerin gastrik kanser gibi bazı klinik sonuçlar ile önemli ilişkisi olduğu bildirilmiştir (45).

Membran kanallarının yanı sıra, VacA'nın reseptör benzeri tirozin fosfataz proteinleri (RPTPs) olan RPTP α ve RPTP β 'ya bağlandığı bildirilmiştir. Bu etkileşimin peptik ülser oluşumuna yardımcı olduğu düşünülmektedir (88). VacA'nın RPTP- β 'ya bağlanması hücre vakuolizasyonuna neden olur ve Git1 fosforilasyonuyla sonuçlanan sinyal yolağını aktive eder. Vakuolizasyon ve Git1 fosforilasyonuna neden olan RPTP β 'nın hücre dışı bölgeleri tanımlanmıştır (79). Ayrıca, VacA proteininin hem m1 hem m2 formlarının RPTP α ve RPTP β 'ya bağlanabildiği gösterilmiştir. RPTP molekülünün ekstrasellüler domainleri farklı hücrelerde diferansiyel post translasyonel modifikasyonlar (glikolizasyon) geçirirler ve bu modifikasyonların VacA'nın bağlanma aktivitesini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, VacA'nın m1 veya m2 formlarına karşı hücresel yanıtının bir kısmının en azından RPTPs post-translasyon modifikasyonları ile kontrol edilebileceği düşünülmektedir (88).



Şekil 7. VacA'nın hücre içerisine girişi ve indüklediği sinyal yolları

*6'ncı kaynaktan alınmıştır.

Torres ve ark. VacA'nın iki domaini olan p33 ve p55'in birbirleri ile moleküller arası etkileştiğini ve bu moleküller arası etkileşim ile bağlanmada, hücreye alınmada ve VacA'nın vakuol oluşturma aktivitesindeki rollerini bildirmişlerdir (89). Epitel hücrelerin yüzeyine p33 ve p55 domainlerinin tek tek bağlandığında, vakuolün sitotoksik aktivite göstermediği; buna karşın, domainler beraber bağlandığında p33/p55 protein kompleksinin hücre vakuolizasyonunu indüklediği gösterilmiştir (79). Oluşturulan VacA modelinde p55 monomerlerinin membran por oluşumunda oligomerler içinde bir araya geldikleri bildirilmiştir (80). VacA'nın p33 domaini anyon seçici membran kanal oluşumu için gerekli hidrofobik bir amino terminal bölge içerir. Bu bölge çoğunlukla transmembran oligomerizasyonuna arabuluculuk eden üç GXXXG sekans motiflerini içerir (79). Kim ve ark. oluşturdukları heksamerik VacA anyon seçici membran kanallarının yapısal modelinde GXXXG motifinde bulunan glisin (Gly) rezidülerinin kanal oluşumunda Alanin veya Valin zincirlerine karşı bağlandıkları bildirilmiş, ayrıca, Gly-14 ve Gly-18 rezidülerinin ise membran kanallarının yapısında en kuvvetli bağlar olduğu, bu rezidülerin vakuol oluşturan sitotoksik aktivite ve VacA membran kanal oluşumu için önemli oldukları saptanmıştır (90).

VacA'nın gastrik epitel hücrelerdeki etkisinin yanı sıra salgılanan VacA'nın granülosit, monosit gibi hücre tiplerinde derin dokular içine penetre olduğu bildirilmiştir (6). VacA'nın ilk olarak Rac1 GTPaz ile kontrol edilen filamentöz aktin (F-aktin) yapısının

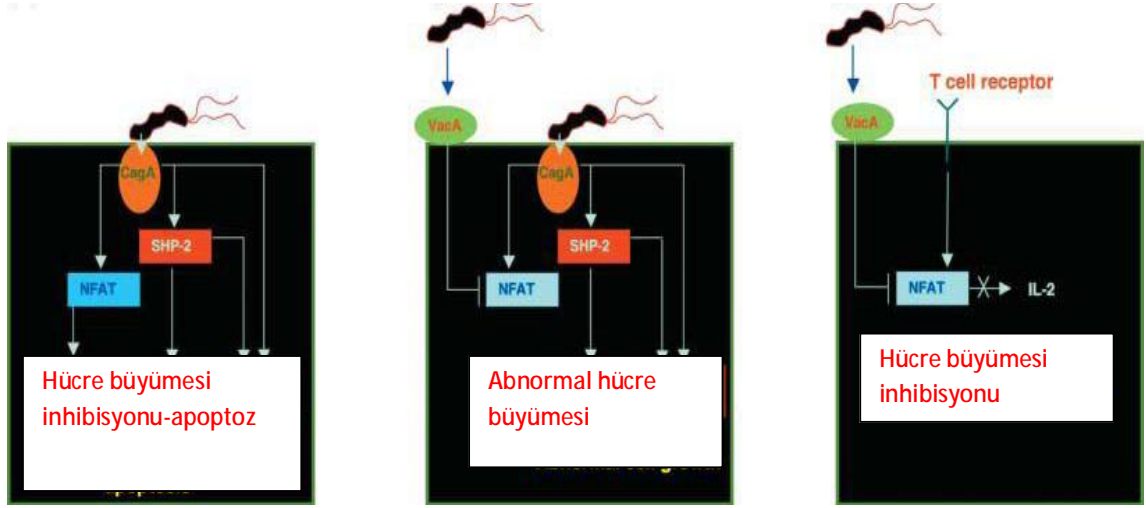
altındaki plazma membran bölgesine bağlandığı; daha sonra klatrinden bağımsız Cdc24 ile kontrol edilen erken endositik kompartman içinde pinositoz edildiği ve vakuol oluşumunu uyararak geç endozom oluşturduğu bildirilmiştir (88). CD2-associated proteininin (CD2AP) VacA içeren erken endozom ile F-aktin arasında köprü oluşturduğu, F-aktin yapısını düzenlediği, VacA'nın erken endozomdan geç endozoma transferi için gerekliliği ve VacA'nın erken endozom oluşumunda dinamik F-aktin yapısına gereksinim gösterdiği bildirilmiştir (80). *H. pylori* epitel hücre kültürü işlemlenmesinde kullanılan Golgi parçalama ajanı Brefeldin A (BFA)'nın VacA'nın indüklediği hücre vakuolizasyonunu artırdığı ve ayrıca VacA'nın düşük toksik formları ile hücrenel vakuolizasyonu indüklediği gösterilmiştir (79).

VacA, T hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonunda rol alır. Transforme T hücre hattında, VacA optimal T-hücre aktivasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörü nükleer faktör-κB aktivasyonunu (NFAT) inhibisyonu ile T-hücre canlılığı ve proliferasyonu için gerekli olan interlökin-2 (IL-2) salınımını bloke eder. Sundrud ve ark. VacA'nın NFAT aktivasyonu ve IL-2 ekspresyonundan bağımsız mekanizmalar ile aktive CD4+ T-hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (91).

VacA sitozol içine geçer, sonra mitokondri iç membranında toplanır ve endojen mitokondri kanalları aktive olur, böylece apoptoz uyarılır. VacA'nın proapoptotik etkisi hücre tipine bağlıdır ve gastrik epitel hücrelerde sınırlı kalacağı düşünülmektedir. CagA'dan farklı olarak VacA'nın T hücre apoptozunu uyarmadığı ve T hücre proliferasyonunu önemli derecede azaltması nedeniyle *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde rolü olabileceği bildirilmiştir (6). VacA, mitokondriden sitokrom-c salınımını Bax ve Bak pro-apoptotik proteinlerini aktive ederek uyarır ve VacA ile uyarılmış apoptozun hücrenin vakuolizasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (88).

VacA ve CagA arasındaki antagonistik ilişkinin patogeneze de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. CagA gastrik epitel hücrelerde bulunan NFAT aktive ederek, sitoplazmadan nükleusa geçmesini sağlar. VacA ise NFAT translokasyonunu aktive eden CagA'nın aktivasyonunu etkisizleştirdiği bildirilmiştir. Transkripsiyon faktörleri olan NFAT ailesi NFAT c 1-4 ve NFAT-5 den oluşan beş üyeden oluşur. NFAT5 dışında NFAT'nin diğer yeleri Ca²⁺/calmodulin-bağımlı serin/trionin fosfataz olan kalsinorin ile kontrol edilir. CagA'nın aktivasyonu olmadığı durumlarda, NFAT proteinleri glikojen sentez kinaz-3β tarafından fosforillenir ve yalnızca sitoplazmada lokalize olur. CagA'nın aktivasyonu

durumunda ise; PLC- γ -bağımlı Ca^{2+} mobilizasyonu tarafından aktive edilen kalsinorin NFAT'yi defosforilize ederek sitoplazmadan nükleusa geçmesini sağlar. NFAT nükleusta spesifik DNA sekansına bağlanır ve NFAT-duyarlı genlerin transaktivasyonunu gerçekleştirir. VacA, T hücreler de NFAT'nin aktivasyonunu T hücre immün yanıtını baskılayarak inhibe ettiği bildirilmiştir (92) (Şekil 8).



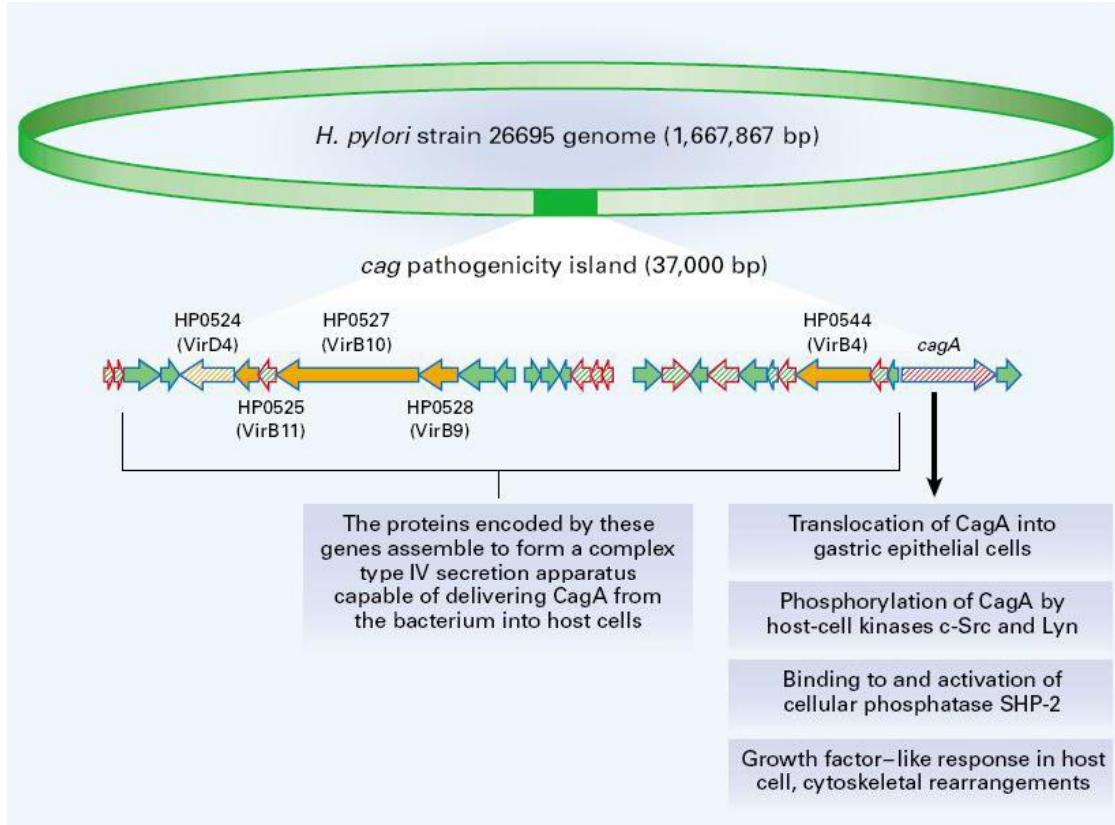
Şekil 8. CagA ve VacA arasındaki antogonistik etkileşim modeli

* 48'inci kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.3. *cag* Patojenite Adası (*cag* PAI) ve CagA Proteini

cag PAI, 27 ile 31 arasında değişen genlerden oluşur ve CagA translokasyonuna olanak sağlayan T4SS komponentlerini kodlar (26,79) (Şekil 9). Bu genlerden 18 tanesi CagA'nın, peptidoglikanın ve diğer bakteriyel faktörlerin konak hücre içerisine girmesi için gerekli olan T4SS komponentlerini kodlar (6). Horizontal aktarılan 40-kb'lık DNA segmenti olan *cag* PAI'nın sonunda lokalize *cagA* genini taşıyan *H. pylori* suşlarının enflamasyon düzeyindeki artış ve şiddetli atrofik gastrit ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (24, 93). *cag* PAI'nin kodladığı diğer iki faktör ise; Cag α ve CagF'dir. Kristal bir yapıya sahip olan Cag α regülatör protein HP1451 ile kompleks içinde hegzamerik bir halka oluşturur ve CagA'nın bakterinin iç membranına geçmesi için geçiş molekülü olarak rol alır. CagF ise CagA'nın C-

terminal salgı sinyalinin yanında bulunan 100 aminoasit bölgesi ile etkileşime giren şaperon benzeri proteindir (80).



Şekil 9. *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunun genom yapısı ve *cag* PAI adası

*55'inci kaynaktan alınmıştır.

1996 yılında Segal ve ark. AGS hücrelerinde *cagA*-pozitif *H. pylori*'de olup *cagA*-negatif *H. pylori*'de olmayan ve özelliği bilinmeyen 145 kDa'luk fosforillenmiş hücresel proteini tanımlamışlar, 1999 yılında ise Segal ve ark. 145 kDa'luk fosforillenmiş bu proteini CagA olarak bildirmişlerdir (94). *cagA* geni 1,147 - 1,181 arasında amino asit kodlayan "open reading frame" içerir (95). *H. pylori*'de *cagA* varlığı; *cagA* pozitif ve *cagA* negatif olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Ancak *cagA*-pozitif suşların gastrik mukozaya zarar verme yeteneği daha fazla olduğu bildirilmektedir (24). *cagA* gen yapısının 5' ucunda yüksek düzeyde korunmuş bölge bulunur ve protein büyüklüğü 3' ucunda yer alan çeşitli sayıdaki tekrar sekansları ile ilişkilidir (25). *cagA* genine sahip *H. pylori* suşlarında gastrik kanser ve peptik ülser riski daha fazladır (93). Duodenal ülser hastalar da *cagA*-pozitif *H. pylori* ile enfekte

oldukları bildirilmektedir. Çünkü *cagA* geninin inaktivasyonu sonucu VacA'nın ekspresyonunda veya IL-8 indüklenmesine etkisi olmadığı görülmüş ve CagA sadece virulansı artıran bir marker olarak düşünülmüştür (95). *cagA*-negatif *H. pylori* suşlarının pH 3'e maruz kaldıktan sonra *cagA*-pozitif *H. pylori* suşlarına göre daha uzun süre canlılıklarını korudukları (96) ve *cagA* geninde üç EPIYA tekrar bölgesi içeren suşların üç'den az EPIYA tekrar bölgesi içeren suşlara göre pH 3'e daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (97). Ancak, *cagA*-pozitif *H. pylori*'nin neden olduğu mukozal lezyon oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir (93).

Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS) ve T4SS konak hücre sine virulans faktörlerin direkt olarak geçmesini sağlayan; bitki ve hayvanları infekte eden birçok bakterinin patogenezinde kritik role sahip sistemlerdir. T3SS *Yersinia spp*, *Salmonella spp*, *Shigella flexneri*, *Enteropatojenik E.coli* (EPEC) ve *P. aeruginosa* türlerinde bulunur. T4SS ise T3SS fonksiyonel olarak benzer fakat evrimsel olarak farklılık gösterir ve konak hücre sitoplazmasına DNA ve/veya proteinlerin transferini sağlar (98). *H. pylori* antimikrobiyal direncin artmasında, T4SS antimikrobiyal tedavide hedef molekül olarak düşünülmüş ve konak hücreye CagA translokasyonunu engelleyen *H. pylori* CagA ATPaz ile *cagA*-pozitif *H. pylori* suşları *in vitro* olarak çalışılmıştır (24). T4SS, IL-8 gibi kemokinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını da indükler (26). T4SS'nin indüklediği proinflamatuvar yanıt mekanizması tam olarak bilinmemekte, iki mekanizma olduğu düşünülmektedir: (i) genomda *cagA* geninin bulunmasının konak hücre sine peptidoglikan fragmentlerinin girmesini kolaylaştırdığı ve bu fragmentlerin intrasellüler "nükleotide-binding oligomerization domain-containing 1" (Nod1) tarafından algılanıp, NF-κB aktivasyonunu gerçekleştirdiği ve (ii) CagA'nın gen değişimi ve mutasyon ile pro-inflamatuvar yanıt oluşturduğu düşünülmektedir (99). Konak sitoplazmasında hücrenin bazal yüzeyinde bulunan β1-integrin, sitoplazmik sinyal transdüksiyon yolağını aktive eden ve CagA translokasyonu için gerekli olan T4SS reseptörü olarak bildirilmiştir (100).

CagA'nın T4SS ile epitel hücre içerisine girmesinden sonra, Abl ve SRC kinaz ailesi tarafından kontrol edilen Y-972, Y-899 ve Y-912 bölgelerinde tirozin fosforilasyonu gerçekleşir (101). Sitoplazmik tirozin kinazlar olan SRC kinaz ailesinin N-terminal kısımları miristillenmiştir ve bu lipid modifikasyonunun SRC kinaz ailesinin membrana tutunmasını sağladığı bildirilmiştir (93). Tirozin fosforillenmiş CagA, spesifik olarak Src homoloji 2

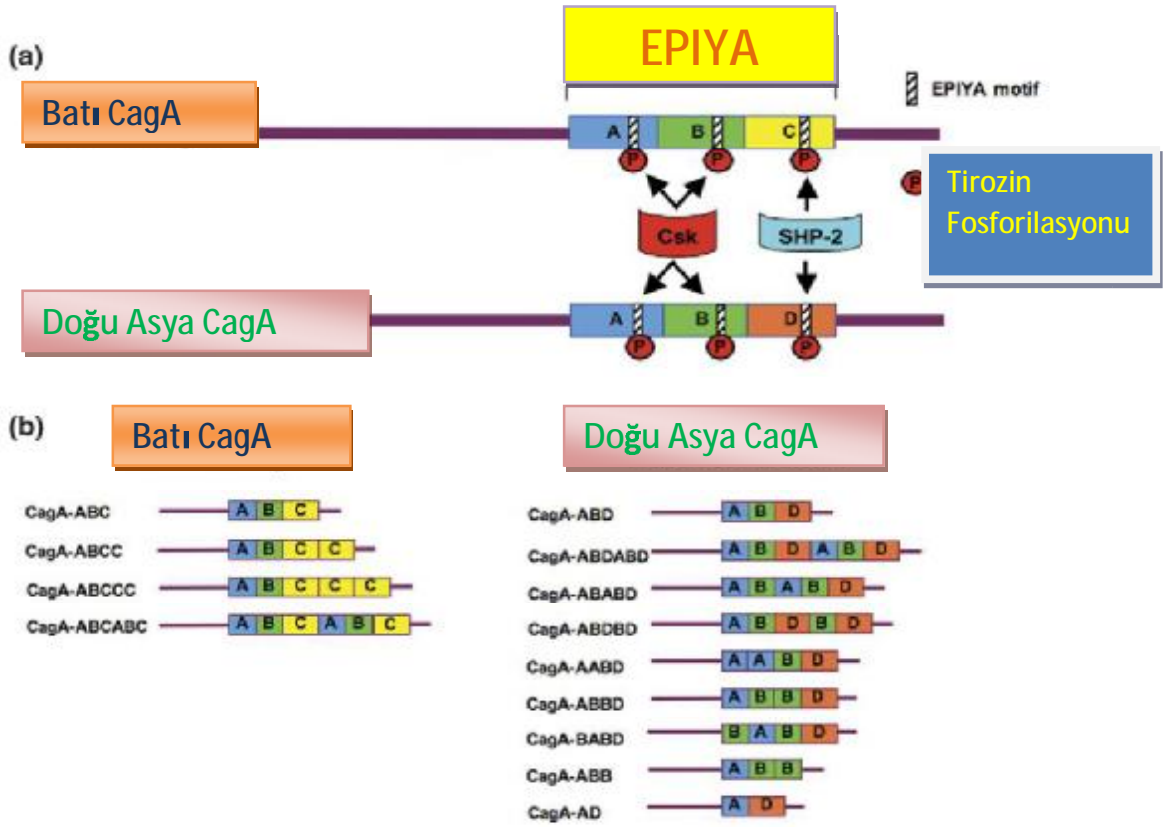
(SH2) içeren tirozin fosfataz-2 (SHP-2) veya C-terminal Src kinaz (Csk) bağlandığı ve enzimatik aktiviteyi uyardığı gösterilmiştir (93).

4.5.1.3.1. EPIYA Motif

CagA'nın tirozin fosforilasyonu, C-terminalinde farklı sayılarda bulunabilen beş aminoasitten (Glu-Pro-Ile-Tyr-Alu) oluşan EPIYA motif bölgesinde gerçekleşir (7,46,48,93) ve CagA'nın fosforilasyonu EPIYA sekansını içeren TPM ile olur (26). EPIYA motiflerini oluşturan bu sekanslardan dört farklı EPIYA segmenti bulunur; EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C ve EPIYA-D. Batı tipi *H. pylori* suşlarının CagA proteinlerinin her biri 32 aminoasit içeren EPIYA-A segmenti ve 40 aminoasit içeren EPIYA-B segmentini 34 aminoasit içeren EPIYA-C segmenti izler (EPIYA A-B-C tip CagA). Doğu Asya *H. pylori* suşlarının CagA proteinleri de EPIYA-A ve EPIYA-B segmentlerini içerir fakat EPIYA-C segmentini içermezler. Bunun yerine, EPIYA-D segmenti denilen farklı EPIYA sekansı içerirler ve Doğu Asya CagA'sı tek bu segmenti (EPIYA A-B-D tip CagA) içerir (Şekil 10). EPIYA-C ve EPIYA-D bölgelerinde bulunan tirozin reziduları sırasıyla Batı ve Doğu Asya CagA için fosforilasyonun temel bölgesidir. Buna karşın, EPIYA-A ve EPIYA-B bölgeleri ise hücrelerde zayıf tirozin fosforilasyon aktivitesi gösterirler. Farklı Batı CagA proteinleri arasında çeşitli sayılarda bulunan EPIYA-C segmentleri genellikle bir den üç'e kadar değişir. CagA proteininde C-terminal değişken bölgesinin içindeki EPIYA motiflerinin bulunduğu tekrar sekansları nedeniyle proteinin büyüklüğünde varyasyonlar görülebilir (48,102). EPIYA-C sayısının tirozin fosforilasyonu seviyesi, SHP-2 bağlanma aktivitesi ve hücre hasarı ile ilişkisi bildirilmiştir. Güney Afrika'da, dört ve altı arasında EPIYA motifleri içeren *H. pylori* suşları ve büyük moleküler ağırlıklı CagA proteinlerinin gastrik kanserli hastalardan izole edildiği bildirilmiştir (22). Azuma ve ark. Japonya'dan izole edilen Doğu Asya *cagA* pozitif *H. pylori* suşları ile enfekte hastaların atrofik gastrit ve gastrik kanser ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (25). C-terminal EPIYA tekrar bölgesindeki 972'inci tirozin rezidüleri (Tyr-972) fenilalanin ile yer değiştiren *cagA* genini taşıyan *H. pylori* suşlarında konak hücre sitoskeletonunu yeniden düzenleme özelliğinden yoksun olduğu, bunun CagA EPIYA Motif fosforilasyonunun aktin sitoskeleton sinyali için kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir. SHP-2'nin CagA'nın tirozin fosforilasyonu için gerekli olduğu ve downstream sinyalini içerdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, CagA'nın başlangıç fosforilasyonunda rol alan ökaryotik tirozin kinazın aktivitesi araştırılmaktadır (103).

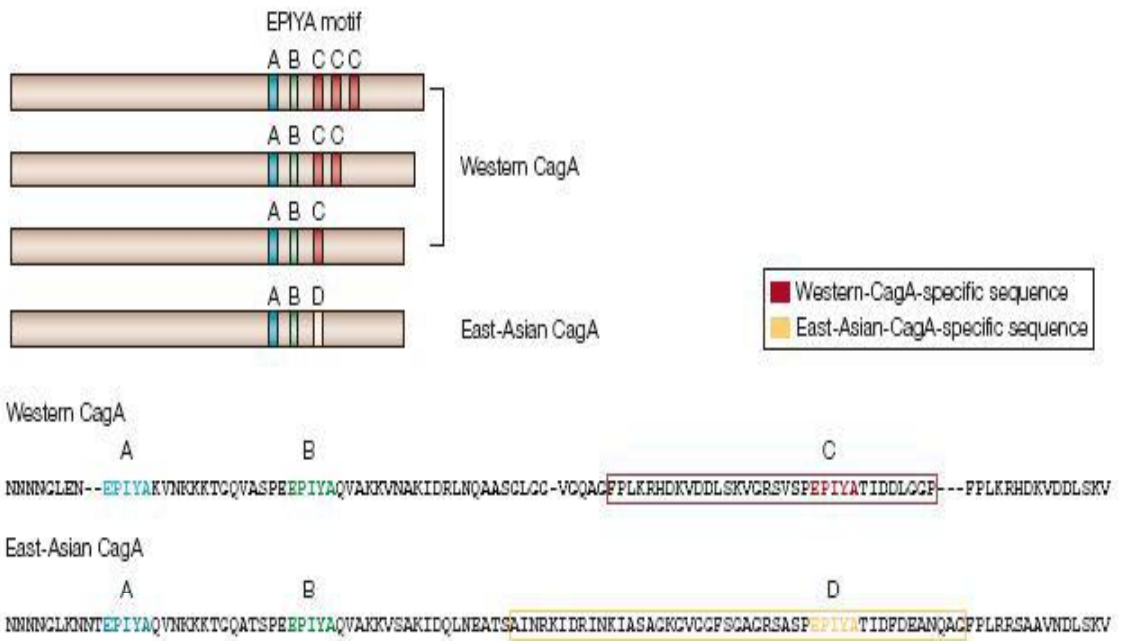
CagA iki ana alt gruba ayrılır; I- Avrupa, Afrika, Amerika, Avustralya (Batı CagA) da bulunan *H. pylori* suşları, II- Doğu Asya ülkelerini içeren Japonya, Kore ve Çin'de (Doğu Asya CagA) bulunan *H. pylori* suşlarıdır (104). Doğu Asya'dan (Kore, Japonya ve Çin) izole edilen suşların % 90'ından fazlası *cagA*-pozitif, Batı ülkelerinden izole edilenlerin %50-60'ı *cagA*-pozitif'tir (25). CagA üreten *H. pylori* suşları *cagA* negatif suşlara göre daha yüksek derecede gastrik mukozal inflamasyona neden olduğu; atrofik gastrit ve gastrik adenokarsinoma ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (102). Batı ve Doğu Asya *H. pylori* suşlarının CagA protein yapısındaki bu değişiklik iki farklı coğrafik bölgedeki gastrik kanser insidansında görülen farklılığın nedeni olabileceği düşünülmektedir (26).

EPIYA motiflerinin sayısı dışında, CagA proteininin alt tiplerinin (Doğu Asya ve Batı tipi) farklı klinik bulgular ile ilişkisi öngörülmektedir (50). Doğu popülasyonundan izole edilen EPIYA motif sayısı fazla olan CagA pozitif-klinik suşlarının daha şiddetli aktif kronik gastrit ve atrofi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (7). EPIYA motif sayısının fazla olduğu Batı ülkesi tip CagA suşlarında yüksek IL-8 sekresyonu ve daha belirgin hücresel elongasyon gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu nedenle EPIYA motif çeşitliliğinin *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde önemli bir bulgu olabileceği ve *H. pylori* suşlarında EPIYA motiflerinin sayısının ve tipinin doğru olarak belirlenmesinin de yararlı bir tanı kriteri olabileceği düşünülmektedir (105).



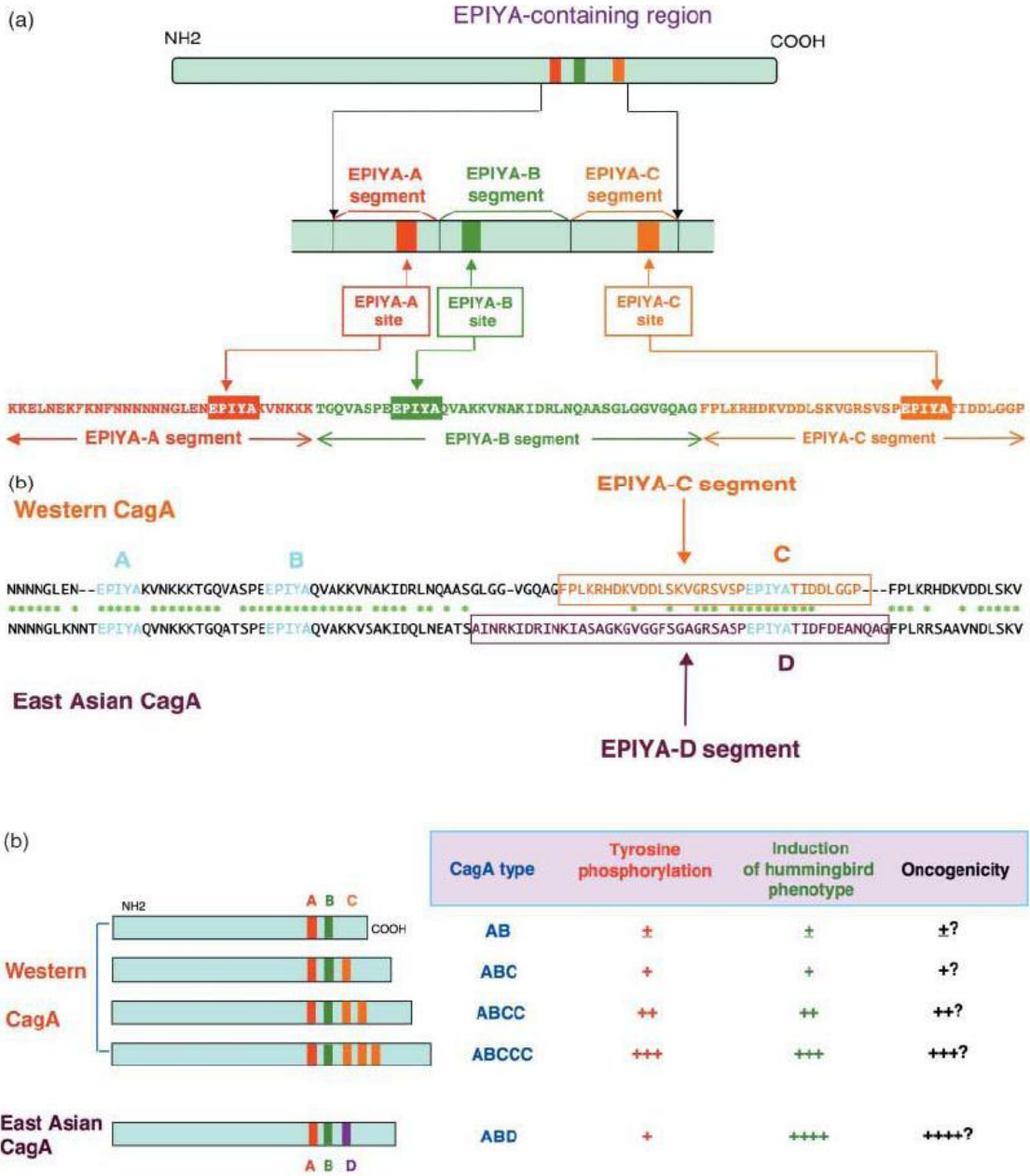
Şekil 10. a- *Helicobacter pylori* CagA Batı ve Doğu Asya EPIYA Motifleri segmentleri (EPIYA-ABC ve EPIYA-ABD) ve Tirozin Fosforilasyonu **b-** *Helicobacter pylori* CagA Batı ve Doğu Asya EPIYA Motif tipleri (EPIYA -ABCC, -ABABD vb.)

*24'üncü kaynaktan alınmıştır.



Şekil 11. *Helicobacter pylori* CagA Batı ve Doğu Asya EPIYA Motifleri segmentleri ve sekans sonucundaki aminoasit farklılıkları gösterilmiştir. EPIYA-A ve -B bölgelerini 1-3 segmentten oluşan 34 aminoasit sekansı içeren EPIYA-C tekrar segmentleri izler.

* 46^ıncı kaynaktan alınmıştır.



Şekil 12. a- EPIYA tekrar bölgelerini içeren CagA'nın moleküler anatomisi b- EPIYA tekrar polimorfizminin CagA'nın patofizyolojik aktivitesi üzerindeki etkisi

* 48'inci kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.3.2. Tirozin Fosforilasyonuna Bağımlı Yolaklar

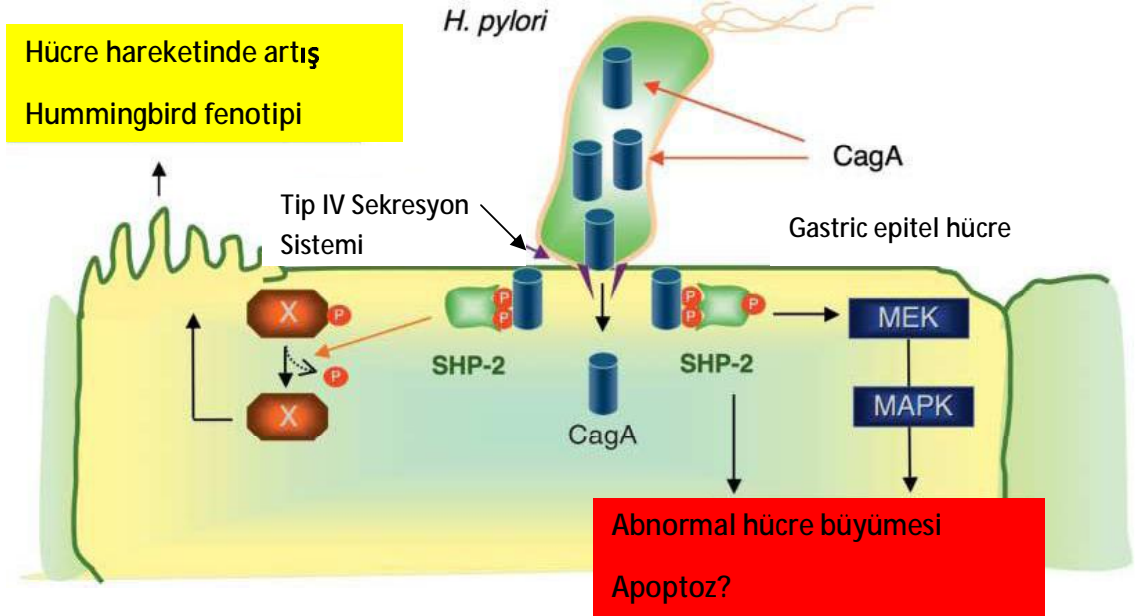
H. pylori'nin gastrik epitel hücreye tutunması bakteri kolonizasyonu için kritik basamaktır. DAF, *H. pylori*'nin reseptörlerinden biri olarak rol alır ve genetik olarak DAF olmayan farelerde *H. pylori*'ye karşı azaltılmış inflamasyon yanıt gözlenmiştir. *cagA*-pozitif *H. pylori* suşlarının gastrik epitel hücreye tutunmasını T4SS ile CagA'nın hücreye translokasyonu izler. Bu translokasyon *H. pylori* CagL ve konak integrin arasındaki etkileşim boyunca devam etmektedir. CagL, T4SS pili yüzey hedefidir ve Arg-Gly-Asp (RGD) motifine bağımlı olarak konak integrin $\alpha 5\beta 1$ 'e bağlanan spesifik bir adezin olarak rol alır. CagL-integrin etkileşimi ile CagA'nın gastrik epitel hücre içine T4SS ile translokasyonu başlar ve aynı zamanda fokal aktivasyon kinaz (FAK) ve Src kinaz uyarılır. Ayrıca, cDNA CagA'nın etkin bir tirozin fosforilasyonu ile gastrik epitel hücre içinde eksprese edilmesi CagL-integrin etkileşiminin CagA tirozin fosforilasyonu için gerekli bir ön koşul olmadığını göstermiştir (24).

Epitel hücrelere geçtikten sonra CagA plazma membranına lokalize olmakta, tekrarlayan Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motiflerinin içindeki spesifik tirozin rezidüleri üstünde bulunan birçok SFKs tarafından tirozin fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Sitozol içinde CagA, Src kinaz ailesi (c-Src, Fyn, Lyn, ve Yes) (24,25,48) tarafından fosforillenir ve daha sonra SHP-2 fosfataz ile etkileşime girerek epitel hücrenin uzaması ile "hummingbird" fenotipi oluşur (7,25,50). Src kinaz ailesi ile CagA'nın EPIYA fosforilasyonun yanı sıra diğer bir sitoplazmik kinaz olan c-Abl aracılığı ile de fosforilasyonu gerçekleşebilir. Bu nedenle konak hücre de CagA'nın tirozin fosforilasyonunun sürekli olarak gerçekleşmesi Src ve c-Abl arasındaki kooperatif etkileşim aracılığı ile olabileceği bildirilmiştir (24).

SHP-2; iki çift tekrarlı N-terminal SH2 domaini (N-SH2 ve C-SH2), tek katalitik protein tirozin fosfataz (PTP) domaini ve C-terminal kuyruk içerir. Batısal CagA ve Doğu Asya CagA'nın SHP-2 ile etkileşimi sırasıyla tirozin fosforillenmiş EPIYA-C ve EPIYA-D bölgeleri aracılığı ile gerçekleşir. SHP-2 domainleri olan N-SH2 ve C-SH2'nin her ikisi de CagA-SHP-2 etkileşimi için gereklidir. Buna karşılık tek bir EPIYA-C veya EPIYA-D segmentleri CagA'nın SHP-2 ile fiziksel kompleks oluşturması için yeterlidir ve SHP-2'nin SH2 domainleri yoluyla tirozin fosforillenmiş iki CagA ile aynı zamanda etkileşime girdiğini göstermektedir (24). CagA tarafından SHP-2'nin regülasyonu bozulduğunda Erk MAP kinazın (MAPK) aktive olmasına neden olur (103). MAPKs; ERK, JNK ve p38 alt ailelerini

içeren bir serin/trionin kinazdır. JNK ve p38 inflamasyonu düzenlerken, ERK ise mitojeniktir, hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eder. CagA hem SHP-2 bağımlı hem de SHP-2 bağımsız mekanizmalar ile ERK MAP kinaz aktivasyonunu sağlar. CagA tarafından ERK'in regülasyonunun bozulması G1-S progresyonunu sağlayan siklin D1'i indükler, gastrik stromayı parçalayan MMP-1'in salınımına yol açar (24). Matriks metalloproteinazlar (MMPs) salındığında ve aktive olduğunda ekstrasellüler bağ dokuyu parçalarlar. Proinflamatuvar sitokinlerden olan interlökin-1 β ve TNF- α gastrik epitel hücreleri MMPs sentezi için uyararak gastrik epitel hücrelerden MMPs'ler salgılanır. Ayrıca, gastrik epitel hücrenin *H. pylori* ile karşılaşmaları MMP-3, -7 ve -9 içererek MMPs sekresyonu ile sonuçlanır. MMPs ekspresyonunun up-regülasyonu (fazla olması) insanlarda ve hayvan modellerinde gastrik ülserasyon ve neoplazi ile ilişkilidir, bu da MMP'lerin gastrik dokuda erozyon ve/veya tümör invazyon da katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (105-107). CagA ve özellikle CagA tirozin fosforilasyon bölgesi (EPIYA Motif) optimal ERK aktivasyonu ve MMP-1 sekresyonu için gereklidir (105). SHP-2'nin mitojenik sinyal uyumunun sağlanması (transduction), migrasyonun düzenlenmesi ve *H. pylori*'nin konak hücrelere adezyonda önemli bir rolü bildirilmiştir. SHP-2'nin fonksiyonunu değiştiren mutasyonlar insanlardaki çeşitli maliniteler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. CagA'nın regülasyonunu bozduğu SHP-2'nin gastrik karsinoma oluşumundaki rolü bildirilmektedir (24).

Tirozin fosforillenmiş CagA ve SHP-2 arasındaki kararlı kompleks oluşumu için homodimerizasyon olan CagA multimerizasyonuna gerek olduğu bildirilmektedir. CagA'nın multimerizasyonu, CagA tirozin fosforilasyonundan bağımsızdır ve C-terminal EPIYA tekrar bölgesinde yer alan 16 aminoasit (FPLXRXXXVXDLSKVG) uzunluğundaki CagA-multimerizasyon (CM) sekansı aracılığı ile olur (24, 101). CM sekansında bulunan 11 aminoasit hem Batı hem de Doğu Asya'da korunmuş olarak bulunur. Batı tip CagA (EPIYA-ABC) suşlarında her bir EPIYA-C Motifi multiple CM motifine sahiptir ve yalnızca bir tane CM motifi en sondaki EPIYA-C Motifinin distalinde, en ucunda bulunur. Ancak, Doğu Asya CagA suşlarında (EPIYA-ABD) ise tek bir CM Motifi bulunur ve EPIYA-D Motifinin distalinde, en ucunda yer alır. Sicinski ve ark. Kolombiya'dan izole edilen *H. pylori* suşlarında birden üçe kadar EPIYA-C motifi içeren EPIYA-ABC, EPIYA-ABCC, EPIYA-ABCBC, EPIYA-ABBCC veya EPIYA-ABCCC CagA paternlerinin bulunduğu ve ayrıca hem Batı hem de Doğu Asya CM Motifi içeren Kolombiya'dan izole edilmiş *H. pylori* suşlarının Batı CagA-spesifik sekansı (WSS) içerdiklerini bildirmişlerdir (101).



Şekil 13. *Helicobacter pylori* CagA ve SHP-2 arasındaki fiziksel ve fonksiyonel ilişki CagA bakteriyel Tip IV Sekresyon Sistemi ile *H. pylori*'nin tutunduğu gastrik epitel hücre içerisine girer. Transloke olan CagA proteini plazma membranının iç kısmında lokalize olur ve Src kinaz ailesi tarafından tirozin fosforilasyonu gerçekleşir. Tirozin fosforilasyondan sonra, SHP-2'ye bağlanır ve fosfataz aktivitesi aktive olur. CagA'nın SHP-2'yi aktive etmesi ile hem hücre büyümesi hem de hücre morfolojisini regüle eden Erk MAP kinaz aktivitesi gerçekleşir. SHP-2 ayrıca yüksek hareket özelliği ile ilişkili olan hummingbird fenotipini uyaran hücre substrat (X)'i defosforilize eder. (X: FAK, Fokal Adezyon Kinaz'ın SHP-2 ile defosforilasyonu)

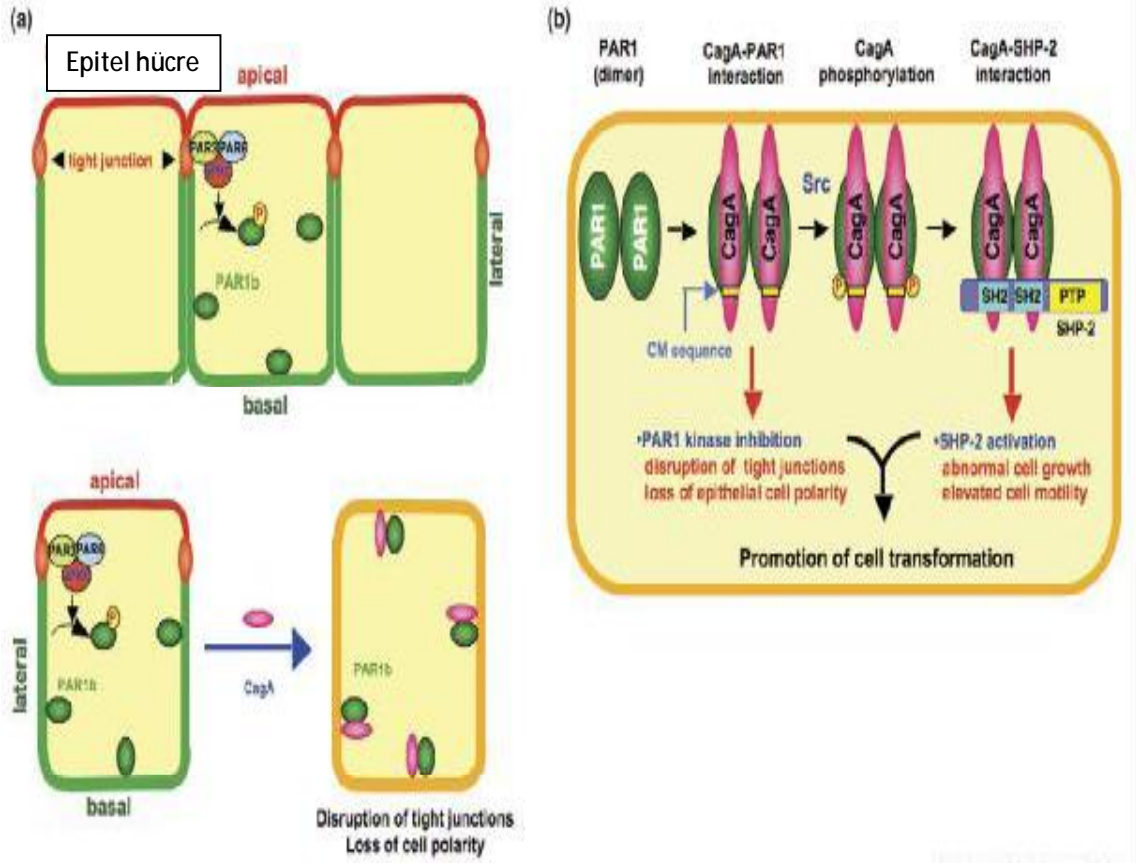
*24'üncü ve 48'inci kaynaktan alınmıştır.

4.5.1.3.3. Tirozin Fosforilasyondan Bağımsız Yolaklar

CagA'nın fonksiyonunun yanı sıra; hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olan CagA'nın fosforilasyondan bağımsız aktivitesi de gösterilmiştir (26).

Gastrik mukoza epiteli sindirim, absorpsiyon ve salgılama fonksiyonunu kontrol eden inner (iç) hücre tabakasıdır. Ayrıca, patojenik mikroorganizmalara karşı tek bariyerdir. Sağlıklı epitelin yapısı normal olarak apikal-bazal polaritesi korunmuş, sitoskelet yapısında yüksek aktin ve tümör supresör ve/veya anti-metastatik özellik gösteren birleşme (junctional) kompleks ile oluşur. Önemli olan, junctional kompleks, tight junction ve E-kaderin aderans junction içeren lateral hücre-hücre etkileşimi veya FAK olarak bilinen bazal eksprese olan hücre-matriks etkileşimleridir (100).

“Tight junction” (Sıkı bağlanma), polarize epitel hücreler için intrasellüler adezyon yapısı için önemlidir ve bu bağlanma epitele moleküler geçişi, integral protein ve lipidlerin difüzyonunu önler (100). CagA'nın translokasyonu intrasellüler sinyallerin regülasyonunu bozması yanında, hücre-hücre adezyonu ve hücrenin bariyerinin temelini oluşturan epitel hücredeki apikal bağlanmayı da bozar. CagA aktivitesi, partitioning-defective-1 (PAR1)/microtubule affinity regulating kinaz (MARK) ile CagA'nın spesifik etkileşimi ile gerçekleşir. Serin/trionin kinaz olan PAR1 *Caenorhabditis elegans*'dan izole edilmiştir ve hücre polaritesinin temel düzenleyicisi olarak bildirilmiştir. Hücre polarizasyonu atipik protein kinaz C (aPKC/PAR3/PAR6 kompleks) (Apkc kompleksi) ve PAR1'in ayrılması ile devam eder. Polarize epitel hücrede, PAR1 bazolateral membranda bulunurken, aPKC kompleksi spesifik olarak apikal membranda bulunur. Apikal membranda gelen PAR1, aPKC tarafından fosforillenir ve membrandan sitoplazmaya geçer. Diğer taraftan, lateral membranda bulunan aPKC kompleksi PAR1'in PAR3'ü fosforillemesi ile bu kompleksin stabilizasyonunun bozulmasına neden olduğu bildirilmektedir (24). Tight junction; “junctional adezyon molekül” (JAM)-1, “occludin”, “claudin”, “zonula occludens” (ZO)-1 ve diğer multiple proteinlerden oluşur. Translokasyon ve membran etkileşiminden sonra CagA, ZO-1 ve JAM gibi tight junction (sıkı bağlanma) proteinleri ile birleşir, bakteriyal tutunma bölgesindeki sıkı bağlanma komponentlerinin ektopik olarak toplanmalarına neden olur (100). Sonuç olarak, CagA tirozin-fosforilasyonundan bağımsız olarak PAR1'in kinaz domaini ile etkileşime girer ve PAR1'in kinaz aktivitesini inhibe eder, böylece bağlanma ve polaritede defekt oluşmasına neden olur (24).



Şekil 14. CagA ve PAR1/MAPK kinaz arasındaki etkileşim (a) Apikal-bazolateral polaritenin regülasyonu. Epitel hücre içerisinde, PAR1 kinaz spesifik olarak bazolateral membranda lokalize olurken atipik PKC, PAR3 ve PAR6'dan (aPKC kompleks) oluşan diğer bir protein kompleksi tight junction gibi apikal membranda lokalize olur. PAR1 ve aPKC kompleksinin asimetrik olarak dağılımı, epitel hücrenin apikal-bazolateral polaritesini devam ettirir. Tight junction da, aPKC bağlanır ve PAR1'i fosforilleyerek membrandan PAR1'in dağılmasını uyarır ve böylece PAR1'in apikal membrana invazyonuna engel olur. (b) CagA ile PAR1 ve SHP-2 arasındaki etkileşim modeli. PAR1 hücrede homodimer olarak bulunur. Hücre içerisine giren CagA CM sekansı ile PAR1 dimerine bağlanır, böylece CagA dimerizasyonunu uyarır. Kompleks oluşumu boyunca, CagA bazolateral membran boyunca PAR1 kinaz aktivitesini inhibe eder, böylece epitel-apikal-bazolateral polarite kaybı başlar. Ayrıca, CagA-ilişkili PAR1 tight junctiondan ve apikalden lokalizasyonunu kaybeder çünkü aPKC tarafından fosforilasyonu gerçekleşmez. PAR1'in apikal membrana lokalizasyonu epitel hücre polaritesinin parçalanmasında katkısı olabileceği düşünülmektedir. EPIYA-C veya EPIYA-D segmentlerinde Src kinaz ailesi ile tirozin fosforilasyonunun gerçekleşmesi sonucu CagA dimerleri SHP-2 ile etkileşim yeteneği kazanırken SHP-2 ise normal olmayan fosfataz aktivitesi kazanır

*24'üncü kaynaktan alınmıştır.

Kolorektal karsinogenez de önemli olan Wnt/ β -katenin ve CagA arasındaki ilişki bildirilmiştir. β -katenin aktivasyonu gastrik kanser oluşumunda kritik rol oynadığı belirtilmiştir. CagA tarafından β -kateninin aktivasyonu CagA tirozin fosforilasyonundan bağımsızdır ve E-kaderin ile CagA etkileşimi sonucu membranda E-kaderin/ β -katenin kompleksinin stabilizasyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Membranöz Wnt/ β -katenin sinyali ile aktive olmadığında ise β -katenin'nin nükleer translokasyonuna neden olduğu bildirilmiştir CagA ile regülasyonunun bozulma mekanizması bilinmemekte, ancak CagA-Crk etkileşiminin β -kateninin regülasyonunu indüklediği bildirilmiştir. CagA tarafından β -katenin sinyalinin anormal aktivasyonunun intestinal metaplazi oluşumunda önemli bir rolü olabileceği bildirilmiştir. β -kateninin anormal aktivasyonu potansiyel onkogenik *H. pylori* ile ilişkisinin olduğu deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, CagA'nın CM sekansları β -katenin sinyallerinin regülasyonunun bozulmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (24). β -katenin sinyallerinin deregülasyonuna neden olan APC veya Axin genleri ile β -katenin mutasyonunun kolorektal kanser, pankreatik kanser ve hepatosellüler kanser ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan, β -katenin sinyalini etkileyen genetik değişikliğin E-kaderin mutasyonu sonucu oluşan kalıtsal gastrik kanser hariç diğer gastrik kanserlerde ortak olmadığı bildirilmiştir (104). E-kaderin fonksiyonu; (i) E-kaderin ekspresyonunu azaltarak (ii) E-kaderin ve katenin sinyal yolunda mutasyon (iii) E-kaderin proteazın deregülasyonu ile inaktive edilebilir (100). CagA ayrıca Src kinaz inaktivasyonunu ve cortactin defosforilasyonu, c-Met reseptörü veya C- γ fosfolipaz, ZO-1 ve adaptör molekül Grb-2'yi indükler. Aktin filamentleri ve membran proteinleri arasında bağlayıcı protein ve mikrovili komponenti olan ezrin de bu grupta yer alabileceği ve ezrin'in CagA- bağımlı defosforilasyonunun *H. pylori*'nin hem bağlanmasında hem de invazyonunda rolü olabileceği bildirilmiştir (50). E-kaderin kompleksinin F-aktinin α -aktin kısmına bağlanan "epitel protein lost in neoplasm" (EPLIN) adlı bir proteini de içerdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, *H. pylori* enfeksiyonunda α -aktin ve EPLIN'in sitoskelet yapısında aktinin regülasyonunu ve E-kaderin adherens junction kompleksinin stabilitesindeki rollerinin belirlenmesi gerekliliği bildirilmiştir (100).

Csk ve Crk adaptör proteinleri tirozin fosforilasyonundan bağımsızdırlar ve ayrıca fosforilasyondan bağımsız olarak Grb2 ve c-Met ile de ilişkilidirler. *H. pylori* ile enfeksiyon gastrik epitel hücrede bulunan hepatosit büyüme faktörü (HGF) reseptörü c-Met aktivasyonuna neden olur. *H. pylori*'nin aktive ettiği c-Met otofosforillenir (kendi kendine

fosforillenir) ve CagA fosforilasyonundan bağımsız olarak CagA ile etkileşime girme yeteneği kazanır. CagA-c-Met etkileşimi hem hücre proliferasyonu hem de hücre hareketini uyaran c-Met reseptör sinyalinin etkisini artırır. CagA Grb2 adaptör proteini ile etkileşime girer ve Ras-MAP kinaz yolağını aktive eder. CagA-Grb2 etkileşimi, Grb-2'nin SH2 ve SH3 domainlerinde olduğu gibi CagA'nın EPIYA tekrar bölgesine de ihtiyacı olmasına rağmen, bu etkileşim CagA'nın tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir (102).

H. pylori CagA-konak hücre etkileşimi “bakteriyal karsinogenez” için yeni bir model ortaya koyabilir. Klinik açıdan; gastrik kanser oluşma riskini artıran konak ve *H. pylori* faktörlerinin tanımlanması gastrik kanser önlenmesi için tedavide yeni strateji gelişiminde umut verici olabileceği bildirilmiştir (7).

Tablo 2. CagA ile etkileşime giren proteinler ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonundaki rolleri

CagA'nın etkileşime girdiği molekül	Fonksiyonu	CagA EPIYA motif ile tirozin fosforilasyon etkinliği
Abl	CagA'nın ve CrkII adaptör proteinin fosforilasyonu	Belirsiz
E-kaderin	AJs, β -katenin sinyalinin destabilizasyonu	Hayır
CrkI, CrkII	Hücre uzaması, AJs kaybı, MAPK sinyali	Evet
Csk	Src inaktivasyonu, CagA-SHP-2 etkileşimi kaybı	Evet
Grb2	Hücre uzaması, Ras MAPK sinyalinin aktivasyonu	Hayır
c-Met	Hücre uzaması, ERK kinaz aktivasyonu	Hayır
Par1	Par1 aktivitesini inhibe etmek, apikal bağlanmayı bozmak, hücre farklılaşması	Hayır
PLC-γ	Hücre uzaması	Hayır
Shp-2	Hücre uzaması, ERK kinaz aktivasyonu, FAK tirozin defosforilasyonu	Evet
Src	CagA fosforilasyonu	Belirsiz
ZO-1	Lateral bağlanmanın bozulması	Hayır

* 100'üncü kaynaktan alınmıştır.

4.5.2. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Patomekanizması

Gastrik mukozadaki *H. pylori* patolojisi kaskad olayları ile gerçekleşir. Bakterinin gastrik mukoza kolonizasyonu kronik gastrit oluşumu ile sonuçlandı; bazı hastalarda ise kronik gastritin ülser veya kansere dönüştüğü gözlenmiştir. *H. pylori* enfeksiyonu kanser oluşumunda, ilerlemesinde ve kanser hücrelerinin yayılmasında önemli rol oynamaktadır (88).

H. pylori'nin indüklediği patolojik değişikliklerin mekanizması proinflamatuvar sitokin olan NF- κ B'nin aktivasyonunu ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu arttırır. NF- κ B uyarıcı kinaz (NIK) ve p21 uyarıcı kinaz 1 (PAK1) arasındaki direkt etkileşim *H. pylori* enfekte epitel hücrelerde gösterilmiş ve proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α 'nın endojen tümör promotörü olduğu bildirilmiştir. TNF α -uyarıcı protein (Tipalpha) gen ailesi tanımlanmış; Tipalpha ve HP-MPI'nin *H. pylori* ile ilişkili yeni karsinogenik proteinler olduğu bildirilmiştir. Tipalpha gen ailesi ve proteini *H. pylori* için tek olduğu ve Ras protein ve NF- κ B aktivasyonu ile tümör-destekleyici aktivitesinin ortak çalıştığı gösterilmiştir (88). *H. pylori*'nin NF- κ B'yi aktive ettiği ve bundan dolayı T4SS ile CagA'nın değil, peptidoglikanın translokasyonu sonucu IL-8 ve diğer proinflamatuvar sitokinleri uyardığı bildirilmiştir. Brandt ve ark. CagA'nın tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak Ras-MAPK kinaz yolağı ile NF- κ B'yi aktive ettiğini, Hirata ve ark. ise *H. pylori* 'nin NF- κ B'yi aktive ettiği diğer bir yolun ise gastrik epitel hücrelerde I κ B kinazı (IKK) uyarması ile oluştuğunu böylece *H. pylori*'nin birçok farklı mekanizma ile NF- κ B'nin transkripsiyonunu aktive ettiğini göstermişlerdir (108,109).

cag PAI ve OipA'nın yanı sıra, HSP60 ve DNA bağlı RNA polimerazın β -alt ünitesini kodlayan *rpoB* gen polimorfizminin epitel hücrelerden IL-8 indüksiyonuna arabuluculuk eden faktörler olduğu gösterilmiştir (79). Cho ve ark. *H. pylori*'nin NF- κ B ve MAPK aktivasyonu arasındaki ilişkide *H. pylori* enfekte AGS hücrelerinde ERK'nin I κ B α fosforilasyonunu uyardığını bildirmişlerdir (110).

Maciorkowska ve ark. *H. pylori* enfeksiyonlu gastritli çocuklarda adezyon molekülleri olan ICAM-1, VCAM-1 ve P- selektin seviyelerini değerlendirerek bu çocuklarda VCAM-1'in en yüksek seviyeye ulaşırken ICAM ve P-selektin'in *H. pylori* negatif ve *H. pylori* pozitif gruplarda bir farklılık göstermediklerini bildirmişlerdir (111). Chang ve ark. hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli olan siklin D1'in eksprese edilmesinde CagA'nın

etkisinin araştırılmasında *H. pylori*'nin uyardığı siklin D1 ekspresyonunun *cagA* mutantlarında azaldığı, API ve CAMP yanıt elemanlarının (CRE) siklin D1 ekspresyonunu uyardığını bildirmişlerdir (112).

Chan ve ark. kaderin gibi adezyon glikoprotein ailesinin sadece adezyon da görev almadıklarını tümör-oluşumu ve karsinogenezden de sorumlu olduğunu ve *H. pylori*'nin uyardığı adezyon molekülleri VCAM-1 ve kaderinin gastrik mukozal inflamasyon patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir. *muc1* genotipi (kısaca *muc1* alleli) gastrik adenokarsinoma ile bağlantılı ve *H. pylori*'nin uyardığı gastrit ve gastrik adenokarsinoma ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (113). *H. pylori* enfeksiyonu patogenezi ve kolonizasyonunda *Muc1* ekspresyonunun etkisi araştırılmıştır, *Muc1(-)* farelerde wild-tip farelere göre önemli derecede daha fazla kolonizasyon ve daha şiddetli atrofik gastrit gözlenmiş ve *Muc1*'in *H. pylori* kolonizasyonunu sınırlayan koruyucu bir bariyer olduğu bildirilmiştir (80).

H. pylori kolonizasyon faktörlerinden üreaz ve hidrogenaz aktiviteleri için metal kofaktörü olan nikel kazanımına gereksinim gösterirler. *H. pylori*'de tanımlanan nikel taşıyıcılarından NixA (HP1077) sitoplazmik membranda lokalize nikel için yüksek afiniteye sahip 37-kDa'luk proteindir. *nixA* geninde mutasyon olması durumunda nikel transportunda ciddi bir azalma ve üreaz aktivitesinde düşmeye neden olur (6). Wolfram ve ark. mikroorganizmalardaki spesifik nikel uptake sistemini tanımlayarak *H. pylori*'de NixA, nikel permeazın regülatör proteini NixR'nin nikel kazanımı arasındaki etkiyi dengeleyen nikel-yanıtında düzenleyici olduğunu bildirmişlerdir (114).

4.5.3. Konak Hücre Yanıtı

Doğal bağışıklık sistemi, patojene karşı savunmanın ilk bariyeridir. Toll-like reseptörleri (TLRs) ve Nod proteinleri konak molekülleridir; lipoproteinler ve peptidoglikan (TLR2), lipopolisakkarit (TLR4), flajellin (TLR5), bakteriyel DNA'nın CpG motifleri (TLR9) ve peptidoglikan (Nod1 ve Nod2) gibi mikrobiyal komponentleri tanırlar (80).

H. pylori'ye karşı sitokin yanıtının TLR2, TLR5 ve TLR9 (ama TLR4 değil) yolu ile aracılık ettiği bildirilmiştir. Bundan dolayı TLR2, TLR5 ve TLR9'un *H. pylori*'yi tanımda baskın doğal bağışıklık reseptörler (dominant innate immune receptors) olabileceği bildirilmiştir (80). Ekstrasellüler TLR4, peptidil-prolil sis-trans izomeraz HP0175 ile direkt olarak etkileşir. HP0175'in uyardığı IL-6 gen ekspresyonunun monositik hücrelerde MAPK

ve TLR4 bağımlı NF-κB aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. TLR2 veya TLR4 makrofajlardan *H. pylori*'nin uyardığı IL-1β ve IL-6 gibi sitokin ekspresyonu için gereklidir. Ayrıca, TLR2'ye bağımlı NF-κB ve MAPK sinyallerinin IL-8 salınımını uyararak HSP60 için gerekli olabileceği ve NF-κB ve MAPK gibi TLR-dolaylı sinyal transdüksiyon yollarının *H. pylori* enfeksiyonu patogeneğinde önemi gösterilmiştir (115).

NF-κB, NF-IL6 ve CRE *H. pylori* enfeksiyonu ile COX-2'yi indüklediği bildirilmiştir (80). Chang ve ark. *H. pylori*'nin uyardığı COX-2 ekspresyonunun COX-2 promotörü ile CRE ve AP-1 aktivasyonu sonucu aşağı gen bölgesinin transkripsiyon faktörleri (CREB-1, ATF-2, c-jun, c-fos) ve özellikle p38'in MAPK'ları aktive ettiği TLR2/TLR9 yolu ile anjiyogenez oluşumunu ve kanser hücre yayılmasını arttırdığını; bunun etkisinin de NS398 ve celecoxib spesifik COX-2 inhibitörü ile inhibe olduğunu bildirmişlerdir (116).

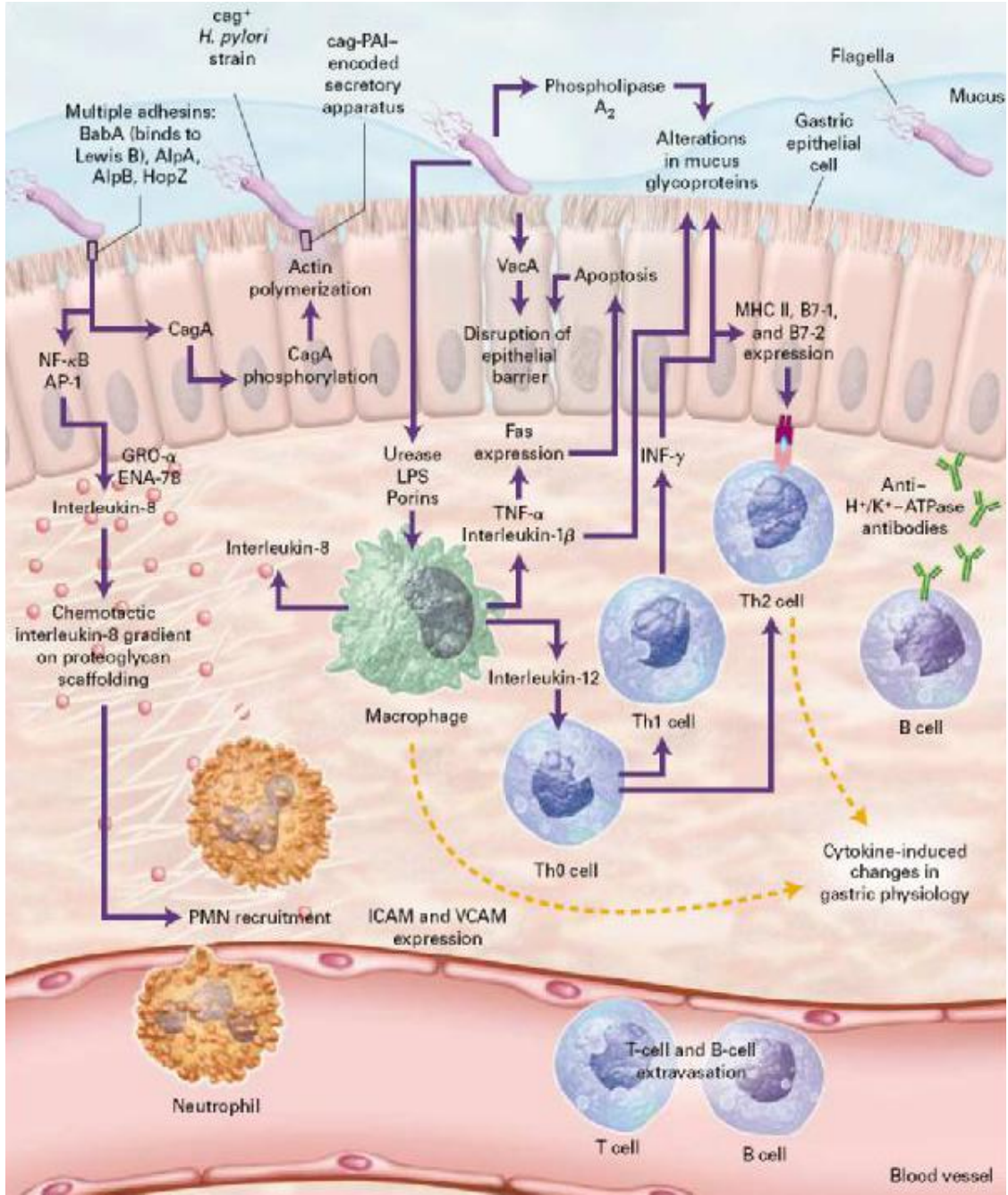
Apoptoz da düzensizlik ve anti-apoptotik yolak *H. pylori* aracılı patogeneşte önemli faktörler olarak tanımlanmıştır (125). Sitokrom-c gibi Bcl-2 protein ailesinin katılması ile *H. pylori*'nin uyardığı hücre ölümü ispat edilmiştir. Son yıllarda, apoptozu düzenleyen mekanizma bazı araştırmacılar tarafından aydınlatılmıştır. Ashktorab ve ark. fonksiyonel ARF ve p53 proteinin uyarır ve bunda *H. pylori*'nin önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir (117).

Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) promitotik ve antiapoptotiktir ve aşırı ekspresyonunun kontrolsüz proliferasyon ve gastrik neoplazi riskinin artmasına yol açabileceği düşünülmektedir. EGFR ekspresyonunun *H. pylori* enfeksiyonu üzerindeki etkisi AGS hücrelerinde çalışılmıştır. *cag* PAI-pozitif suşlarda EGRF transaktivasyonu, ERK fosforilasyonu ve Src aktivasyonu ile EGRF ekspresyonunun önemli derecede artış gösterdiği bulunmuştur (80). Galgani ve ark. *H. pylori* suşlarının fonksiyonel *cag* PAI'nin ekspresyonu ile insan monositlerinde apoptozu uyardığını göstermişlerdir (116). Eguchi ve ark. ise siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p27'nin *H. pylori*'ye karşı gastrik epitel hücrelerin apoptotik yanıtın bir kısmını düzenlediğini bildirmişlerdir (118).

Ayrıca eksternal membran vezikülü olan gama-glutamil transpeptidaz ve VacA gibi virulans faktörlerinin apoptoz için uyarıcı oldukları gösterilmiştir (115). CagA'nın pro ve anti-apoptotik faktörler arasındaki ilişkisi bildirilmiştir (115). CagA'nın Mek → Erk → SRE yolağı ile antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (114). CagA pozitif suşlar ile enfeksiyon, atrofi oluşumunda önemli görevi olan çoğunlukla sinusa ait

küçük kıvrımlarda bulunan gastrik mukozadaki pro-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (115). Bu etkide monositler ve bakteri arasında direkt bağlantı gereklidir fakat VacA ve CagA'dan farklı olarak tanımlanmamış faktörlere de gereksinim duyar. İlginç olarak, *in vitro* üretilmiş monosit türevi dendritik hücreler *H. pylori*'nin uyardığı apoptoza dirençlidirler (79).

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) kanser oluşumu ile ilgili proinflamatuvar sitokindir. Beswick ve ark. *H. pylori*'nin CagA'ya bağlı olarak MIFs uyardığını, MIF'in epitel proliferasyon ve prokarsinogenezdeki rolünün *H. pylori* rekombinantının hücre proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir (119).



Şekil 15. *Helicobacter pylori* patogenezi ve hücre içi yolları

* 55'inci kaynaktan alınmıştır.

4.6. *Helicobacter pylori* ile İlişkili Hastalıklar

H. pylori genellikle yaşam boyu kronik enfeksiyonlara neden olan ve peptik ülserden gastrik karsinomaya, MALT lenfomaya kadar farklı klinik hastalıklar ile ilişkilidir. Ayrıca, kardiovasküler hastalık, solunum sistemi hastalıkları, serebrovasküler hastalık, baş ağrısı ve miğren, Raynaud's Sendromu ve organ spesifik otoimmün hastalıklar (otoimmün tiropati, diabetes mellitus) gibi birçok ekstragastroduodenal hastalıklar ile de ilişkilidir (120).

H. pylori kolonizasyonu nötrofilik ve mononükleer hücrelerin hem antrum hem de korpusda bulunan gastrik mukozada infiltrasyona neden olur. Kronik gastrit, *H. pylori* kolonizasyonu ile oluşan primer durumdur (6). Kronik gastrit atrofinin bulunup bulunmamasına göre iki temel kategoriye ayrılmaktadır. Atrofinin bulunduğu durumlarda genellikle iki tip tanımlanmaktadır: multifokal kronik atrofik gastrit (daha önceleri tip B gastrit olarak bilinirdi) ve otoimmün kronik atrofik gastrit (ayrıca tip A gastrit olarak da bilinmektedir). Multifokal kronik atrofik gastrit de, hem enflamasyon hem de atrofi antrumda oluşmaktadır ve antral gastrit ile ilişkili gastrin üreten hücrelerdeki harabiyetin sonucu olarak serumdaki gastrin konsantrasyonunda azalma görülmektedir. Diğer taraftan, kronik gastritin otoimmün formunda ise enflamasyon ve atrofi hemen hemen gastrit body tarafından engellenmekte ve parietal hücrelere karşı oluşan otoantikörleri (PCA) hastalarda oluşmaktadır (121).

Kronik gastrit gastrik atrofinin gelişimi aşamasında öncü lezyondur. *H. pylori* ve pernisiyöz anemiye yol açan otoimmün gastrit başlıca nedenleridir. Kronik *H. pylori* enfeksiyonu gastritten gastrik atrofiye ilerleyebilir. Korpus enflamasyonu asit sekresyonunun inhibisyonu ve normal hücresel elementlerin kaybı ile sonuçlanır (30).

H. pylori enfeksiyonunun duodenal ülserlerin % 100'ünden ve mide ülserlerinin yaklaşık % 70'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu peptik ülserin tek nedeni değildir. Nonsteroidal anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) nedeniyle daha çok sayıda peptik ülsere neden olmaktadır (30).

Normal midede organize lenf dokusu yoktur fakat *H. pylori* ile enfeksiyondan sonra değişmez bir şekilde lenf dokusu vardır. Mide lenfoid dokusunun oluşumuna kronik *H. pylori* enfeksiyonunun yan ürünlerinden kaynaklanan sürekli antijen stimülasyonunun neden olduğu

düşünülmektedir. MALT oluşumu için stimüle edildikten sonra zaman içinde bu hücrelerden genetik hasar oluşabilmekte ve mide lenfoması gelişimine yol açmaktadır (30).

4.6.1. İlişkili Olduğu Düşünülen Diğer Hastalıklar ve Sendromlar

H. pylori'nin koroner kalp hastalığı, dermatolojik hastalıklar (rosacea, idiopathic urticaria gibi) otoimmün tiroid hastalıkları ve trombositopenik purpura, demir eksikliği anemisi, Raynaud's fenomenon, skloderma, migren ve Guillain-Barre Sendromu gibi ekstragastrik hastalıklar ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (6).

Otoimmün thiropatisi olan hastalarda *H. pylori* prevalansının yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, Bertalot ve arkadaşları *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyon tedavisi sonrası anti-tiroid otoantikörlerinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda mide de gastroparietal hücrelere karşı antikor oluşumunun % 12'den yüksek olduğu bildirilmiştir. Otoimmün gastrit laboratuvar tanısı için en kolay uygulanabilir serolojik yöntem genellikle sıçangillere ait donmuş mide kesitlerinde çalışılan immunofloresan yöntemi kullanılmaktadır (120).

4.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Yöntemler

H. pylori tanısında endoskopi gerektiren invaziv ve endoskopi gerektirmeyen invaziv olmayan yöntemler kullanılmaktadır (122).

4.7.1. İnvaziv Yöntemler

4.7.1.1. Biyopsi Üreaz Testi

Endoskopi sırasında alınan antral biyopsi örneklerinden uygulanan hızlı üreaz testi hem ucuz hem de kolay bir tekniktir (20). Hızlı üreaz testi doğruluğu yüksek olarak (>%90) bir saat içinde *H. pylori* varlığını belirleyen bir testdir. Yanlış pozitif sonuçlar antisekretuar ilaç kullanan kişilerde görülebilir (19). Langenberg ve ark. tarafından *H. pylori*'nin güçlü bir üreaz üretimine sahip olduğu bulunmuştur. Direkt hızlı üreaz tanısı McNulty ve Wise tarafından gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, *H. pylori* üreazı diğer bakteriler arasında en yüksek spesifik aktiviteye (36 ± 28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) sahip olmaktadır. *H. pylori* içeren biyopsi materyali üreze zengin ortama bırakıldığında, üre karbondioksit ve amonyak bileşenlerine parçalanır. Amonyak iyonları pH'yı artırır ve fenol kırmızısı gibi pH indikatörlerinin rengi

sarıdan kırmızı veya pembeye dönüşür (20). Ayrıca farklı yöntemler ile bu testin sensitivitesi yükseltilebilir; (i) üre konsantrasyonunun % 2'den % 10'a yükseltilmesi, (ii) daha yüksek sıcaklıkta (37 °C) inkübasyon (iii) ve tampon ile supresyon. Bunlara ek olarak, biyopsi materyalinin büyüklüğünün önemli olmadığı da bildirilmiştir (20).

İlk jenerasyon ticari kitler agar temeline dayanır; örneğin CLO test (Kimberley-Clark, Neenah,WI). Yeni jenerasyon kitler ise strip-temelli kitlerdir. Bu kitler de iki alan birbirinden çok küçük gözeneklerle ayrılır. Bir alanda üreaz üreyi parçalarken diğer alanda NH₃ bulunur ve pH değişir (PyloriTek, Serim, Elkhart, IN) (20).

4.7.1.2. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik incelemenin *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında kullanılan invaziv yöntemlerden ve endoskopi gerektiren bir tanı yöntemidir (20).

H. pylori genellikle kronik süperfisyal gastrit ile ilişkilidir. Bu pattern epiteldeki nötrofilik infiltrasyon ile ilişkili mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile karakterize edilir ve metaplastik değişiklikler, granulum formasyonu, veya fundus gland atrofisi ile spesifik olarak ilişkili değildir. Mûsin azalması, sitoplazmik vakuolizasyon ve mukozal glandlarda organizasyon bozukluğunu içeren yüzey epitel hücrelerdeki dejeneratif değişiklikler genellikle oluşur. Antimikrobiyal ajanlar ile *H. pylori* eradikasyon tedavisi sonrası; bu dejeneratif bozuklukların çoğu hızlıca kaybolur ancak mononükleer hücreler aylar boyunca kalıcı olabilir (8,123). Genellikle güncelleştirilmiş Sdney Sisteminde önerilen antrumdan iki tane biyopsi örneği ve korpustan da iki tane biyopsi örneğinin alınmasıdır (20, 124). Tedavi sonrasında özellikle PPI kullanıldıysa korpus biyopsisi kısmen daha değerlidir. Bu koşullar altında, organizma antrumda azalmış ya da kaybolmuş olabilir fakat parietal hücreler de hipertrofi ile oluşabilen mukoza geriye kalır. Korpusdan alınan biyopsi materyali gastrit paterninin belirlenmesi için gereklidir (124). Biyopsi materyali hemen fiksatif özelliği olan % 10 fosfat tamponlu formaldehit içerisine konur. Bu fiksasyon işlemi bakterinin morfolojisini korur ve birçok boyama yöntemi de uygulanabilir. Ancak, formaldehit içerisinde saklama süresi kısıtlıdır çünkü bir hafta sonra tanı koymayı zorlaştırır (20).

Gastrit spektrumu üç geniş kapsamlı kategoriye bölünmüştür; akut, kronik ve özel (veya farklı) formlar. Gastrit; atrofinin topografik dağılımına, olup olmamasına temel alınarak iki ana kategoriye ayrılır. *H. pylori* gibi bazı etken ajanların birden fazla gastrit tipinde rol

alabileceği dikkate alınmalıdır. Bazı kişilerde etiyolojik ajanın bulunmasından dolayı histopatolojik olarak birden fazla gastrit tipi de mümkün olabilir (124). Hematoksilen-eozin (H&E) boyamanın yanı sıra; birçok laboratuvarlarda *H. pylori* için özel boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Örneğin, modifiye Giemsa, Warthin-Starry veya yeni Genta boyama yöntemi. Özel boyama yöntemi özellikle H&E boyası ile saptanamayan kronik aktif inflamasyonu olan biyopsi materyallerinde önerilmektedir. İmmunoboyalar ayrıca *H. pylori* saptanmasında önerilmektedir ve kokoid formların tanımlanmasında daha kullanışlı olabilir (124).

4.7.1.3. Kültür

H. pylori kültürü için en iyi materyal endoskopi sırasında alınan biyopsi materyalidir. Dikkat edilmesi gereken hastanın antibiyotik veya antisekretuar ilaç özellikle PPI almamış olması gerekmektedir. PPI'nin gastrik mukozada bulunan *H. pylori* konsantrasyonuna direkt olarak antimikrobiyal etkisi olmamasına karşın, mide pH'sını değiştirerek *H. pylori* dağılımını indirekt olarak etki yapar (20).

H. pylori tanısı için gerekli olan biyopsi materyalinin sayısı tartışmalı bir konudur. Antrumdan alınan tek bir biyopsi materyali (pylorusdan 2 cm) iyi bir duyarlılık gösterir ancak güvenilir bir tanı için yeterli değildir. Aslında, *H. pylori* yamalı dağılıma sahip bir bakteridir ve fazla biyopsi materyalinin analizinin yapılması *H. pylori*'nin tanısını koyma şansını artırmaktadır. Bu konu ile ilgili önerilen; antrumdan iki biyopsi materyalinin alındığı gibi anterior ve korpusdan da iki biyopsi materyalinin alınmasıdır (19,20). Ayrıca, gastrik biyopsiden bakteri kültürünün yapılması *H. pylori* ilaç direncinin belirlenmesi için gereklidir ve böylece yanlış eradikasyon tedavisinden sonraki tedavi stratejisinin belirlenmesi için de önemlidir. Ancak, enfekteli hastalardan *H. pylori* izolasyon oranı % 23.5'den % 97'ye kadar değişiklik göstermektedir. *H. pylori* izolasyonu için inkübasyon süresi 2-7 gün olarak önerilmektedir. Buna karşın, Yan ve ark. ise inkübasyon süresinin 19 gün ve üstü olarak rapor etmişlerdir (125).

Kültür işleminde en önemli noktalardan biri de endoskopi sırasında alınan biyopsi materyalinin taşıma koşullarıdır. Kısa süreli taşıma durumlarına (maksimum dört saat) genellikle yarı katı agar olan transport ortamları da kullanılabilir. Uzun süreli saklama koşulu olarak; biyopsi materyalinin % 17-20 gliserol ile skim milk veya sistein-Albimi buyyon

içerisinde dondurulması gerektiği bildirilmiştir (126). Acil durumlarda örnekler yağsız süt/gliseroL, brucella et suyu/gliseroL veya sistein-Albimi/gliseroL gibi gliseroL içeren bir ortamda 4 °C'de 1 haftaya kadar saklanabilir fakat normale dönüşümde kısmi kayıplar olabilir (30). Eğer transport ortamı uygulanamaz ise biyopsi materyali – 70 °C'de dondurulabilir veya sıvı nitrojen içerisine konup kuru ependorf içerisinde dondurma işlemi gerçekleştirilebilir. +4 °C'de saklamak içinde % 20 gliseroL içeren ortamlar kullanılabilir (20,30).

Standart bakteriyolojik testler içerisinde bulunan mikroskobik inceleme biyopsi materyali kullanılarak smear yöntemi ile yapılabilir. Boyama yöntemleri olarak Gram boyama, Giemsa veya floresan akridin orange boyama yöntemleri uygulanabilir (20). *H. pylori* kültürü için kullanılan ortamlar; agar temelli, büyüme ve seçici supplement içeren ortamlardır. En çok kullanılan ortamlar beyin kalp agar, Columbia agar ve Wilkins Chalgren agar'dır (12,20). Büyüme supplementlerine ek olarak; *H. pylori* büyüme şansını artıran çeşitli besinler (vitamin ve oligoelementler), IsoVitalex içeren kan veya serum da kullanılır. Selektif agarların kombinasyonu (yumurta sarısı emülsiyonu, supplement ve antibiyotikten oluşan Colombia Agar) antral biyopsiden *H. pylori* izolasyonu için optimal kombinasyonlar olarak bildirilmiştir (12,20). Koyun ve at kanı kullanılabilir ancak yapılan çalışmalar sonucunda insan kanının biraz daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. Diğer büyüme faktörlerinden olan yumurta sarısı, kömür, nişasta, sığır serum albumin ve katalaz da kullanılmaktadır. Seçici supplement olarak Gram-pozitif kokları inhibe eden vankomisin veya teikoplanin; Gram-negatif basilleri inhibe eden polimiksin, nalidiksik asit, kolistin, trimethoprim veya sefsulodin; fungusları inhibe eden nistatin veya amfoterisin B içeren antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. En çok kullanılan ise; sefsulodin yerine polimiksin içeren ve amfoterisin B eklenen DENT supplementidir (20). Optimal kültür sıcaklığı 37 °C'dir. Optimal koşullar altında birincil kültür optimum 2-4 gündür. Kültürün negatif olması durumunda, sonuçların negatif olduğunu kesinleştirmek için 7 ile 12 gün inkübasyon önerilmektedir. Kültür yöntemi kuruluk, hava ile temas ve sıcaklık gibi koşullardan etkilenir. Tüm fenotipik ve genotipik identifikasyon testleri gerçekleştirildiğinden kültürün duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 100'dür (20).

4.7.1.4. Helicobacter pylori Moleküler Tanı Yöntemleri

4.7.1.4.1. Biyopsi ve Koloniden Standart PCR Yöntemi

Biyopsi materyalinden *H. pylori* tanımlanması için standart PCR yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde en önemli nokta *H. pylori*'ye spesifik primerlerin dizayn edilmesidir. Örneğin; üreaz operon genlerinden *ureA* ve *glmM* (*ureC*) veya 16S rRNA genleri. Ayrıca, nested veya seminested PCR yöntemleri de önerilmiştir. Ancak, nested PCR ampliconlar ile hava kabarcığı kontaminasyon riskini artırmaktadır ve bu sebeple uygulanması kısıtlıdır. Ayrıca, aynı primerler ile ikinci PCR'in uygulanması da önerilmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından reverse transkriptaz-PCR (RT-PCR) kullanıldığı da rapor edilmiştir. Bu yöntem mRNA temeline dayanır ve bakterinin canlılığı ile ilgili bilgi vermemektedir fakat duyarlılığı ile ilgili henüz daha net bilgiler rapor edilmemiştir. (20)

Standart PCR yönteminin diğer bir önemli avantajı da *H. pylori* patojenik faktörlerini tanımlanabilmesidir. İki tane temel patojenik faktör vardır; *cag* PAI ve *vacA* polimorfizmi. Ayrıca adherans genleri (*babA2*, *sabA*) veya patojenikler (*oipA*, *dupA*, *iceA*) standart PCR yöntemi ile tanımlanabilir. *H. pylori* ve temel virülans faktörlerini tanımlayan test INNO-LİPA (Innogenetics, Ghent, Belgium) dizayn edilmiştir. Bu test *vacA* s bölgesi, *vacA* m bölgesi ve *cagA* için multiple spesifik probalar içeren striplerden oluşmaktadır. *H. pylori* ile ilişkili genler biotin-işaretli PCR primerleri ile amplifiye edilir ve daha sonra strip üzerinde single-step reverse hibridizasyon ile analizi yapılır. Diğer bir teknik ise *vacA* ve *cagA* genotipleri için multipleks PCR yöntemi ve SYBR yeşil I boyası kullanılarak PCR melting curve analizidir (20).

4.7.1.4.2. Biyopsi ve Koloniden Real-time PCR

Son yıllarda, PCR-restriksiyon fragment length polimorfizmi, PCR-DNA enzim immunoassay, reverse hibridizasyon line prob assay ve real-time PCR gibi birçok PCR esaslı metotlar biprob ve hyprobe ile kombine edilerek klaritromisin duyarlılığını saptayabilmek için kültürden izole edilmiş suşlar veya biyopsiler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır (127).

Yeni real-time PCR yöntemi *H. pylori* tanısında büyük bir başarı olarak düşünülmektedir çünkü sadece hızlı ve kesin sonuç vermesinin yanında miktar belirtmesi ve klaritromisine karşı antibiyotik direnci ile ilgili olarak nokta mutasyonlarının belirlenmesi

önemini daha da artırmıştır. Bu metot SYBR yeşil I boyası veya floresan rezonans enerji transferi (FRET) prensipi ile kullanılmaktadır (20).

4.7.1.4.3. Mikroarray

Mikroarray binlerce gen ekspresyonu profilini belirlemek için kullanılan önemli bir tekniktir ve çeşitli biyolojik sistemler ile yapılan çalışmalar da kullanılabilir. Mikroarray; oligonükleotit (oligonükleotit mikroarray) veya bireysel genleri gösteren PCR ürünlerini (genellikle cDNA mikroarray olarak adlandırılan) gibi tüm genom ile mozaik bir şekilde içeren cam lamlardan oluşur. Hibridizasyon Cy3 ve Cy5 floresan boya ile işaretlenmiş iki popülasyonun cDNA (kontrol ve test) ile gerçekleştirilir. Bu teknoloji ile gen ekspresyonu profili ve aralarındaki etkileşim ile ilgili geniş bilgi sahibi olunabilir (128). Bu teknik kullanılarak tam genom sekansı bilinen iki *H. pylori* suşu çalışılmıştır. Örneğin, J99 suşunda 52 spesifik genin ve 110 spesifik genin 26695 suşunda varlığı bulunmuştur (36). Salama ve ark. mikroarray tekniği ile 15 klinik izolat ve 2 tane *H. pylori* genomu bilinen suş kullanılarak 1643 genin analizinde ve 1281 genin test edilen bütün *H. pylori* suşlarında ortak olduğunu, genomun en az %12-%18'zi oluşturan ve fonksiyonları henüz belirlenememiş 160 ve 275 suş spesifik genin varlığını bildirmişlerdir (129). *H. pylori* de her suşa ait birçok spesifik genin patojenite adası ve değişken bölgesinde lokalize oldukları saptanmıştır (128).

H. pylori antibiyotik direnç belirlenmesinde kullanılan geleneksel metotlar PCR-restriksiyon fragment length polimorfizm (PCR-RFLP) veya zaman ve pahalı olan sekans analizidir. Oligonükleotit temelli DNA mikroarrayler gen ekspresyonu ve tek nükleotit polimorfizm (SNP) lerin analizinde kullanışlı bir metot olarak bildirilmiştir (130)

4.7.1.4.4. Proteomiks

İnsan ve *H. pylori* genomunun tamamen bilinmesinden sonra özellikle yüksek risk taşıyan popülasyonlarda patogenezin aydınlatılabilmesi için yeni teknikler geliştirilmiştir. *H. pylori* ile ilişkili önemli bilgilerden örneğin konak hücre ile *in vitro*, hayvan modellerinde, veya enfekte dokularda interaksyonu gösterilse de yapılan çalışmalarda global gen ekspresyonu da gösterilmiştir (131).

Proteomiks proteomlar (bütün izoformlarda, polimorfizmlerde ve post-translasyonel modifikasyonlarda genomdan eksprese edilen proteinlerin toplamı) ile çalışılan bir

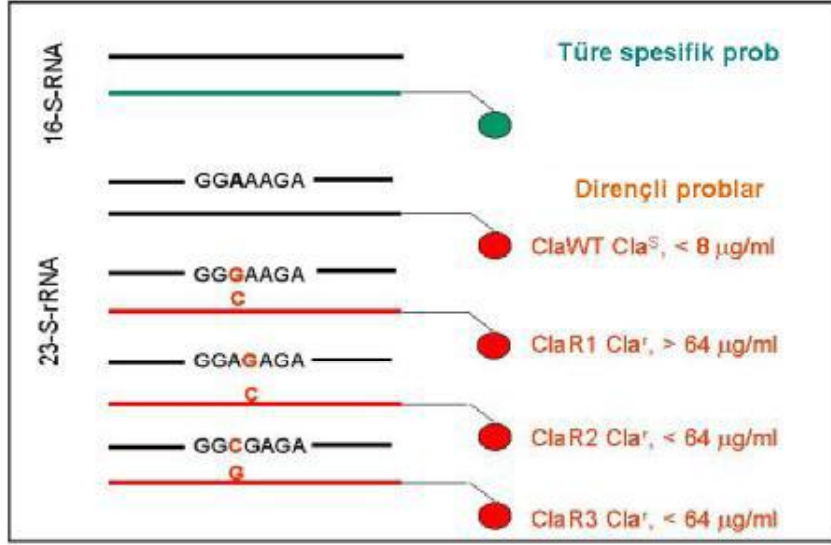
tekniktir. Proteomiks yönteminin temelini iki-boyutlu jel elektroforezi (2D-GE) ve kütle spektrometresi (MS) oluşturur. 2D-GE kompleks protein karışımlarının ayrıştırılmasını sağlar ve MS ile izole edilmiş protein spotlarının sonraki analizi hızlı ve doğru identifikasyonları yapılabilmektedir (155). Bu teknik *H. pylori* de adezyon moleküllerinin analizi çalışmasında kullanılmıştır ve tükürük materyalinde reseptörler araştırılmıştır (132).

4.7.1.4.5. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

In situ hibridizasyon, nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu kinetiğini kullanan özgün bir yöntemdir. *In situ* hibridizasyonun diğer hibridizasyon yöntemlerinden (Southern veya Northern blot) farkı nükleik asitlerin biyolojik açıdan morfolojisi korunmuş hücresel ortamlarında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin biyolojik yapılardaki yeri belirlenmiş olur. Prob seçimine bağlı olarak, belirli genom ve kromozomlar, tekrarlayan DNA dizileri, tek kopyalı diziler, mRNA ve viral diziler gibi farklı hedefler saptanabilmektedir (29).

H. pylori'de FISH yöntemi, ribozomal RNA'nın çoklu kopyaları ile oligonükleotidlerinin tanımlanmasının spesifik DNA-DNA hibridizasyonuna bağlıdır (16S rRNA, 23S rRNA). Floresanla işaretlenmiş *H. pylori* 16S ve 23S rRNA'sına spesifik oligonükleotidler, *H. pylori* hücresine penetre olur ve hedef sekansa bağlanır. Bu test eş zamanlı olarak *H. pylori* ve klaritromisin direncinin saptanmasına olanak verir ve direk olarak gastrik biyopsi örneklerine uygulanabilir (29).

H. pylori için türe spesifik saptama yeşille işaretli 16S rRNA spesifik oligonükleotid Hpy-1 (5'-CACACCTGACTGACTATCCCG-3') ile yapılmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonuna karşı üçlü tedavide kullanılan temel antibiyotik olan klaritromisine karşı direnç 23S rRNA'da tanımlanan üç nokta mutasyonuna dayanmaktadır. Bu nokta mutasyonları kırmızı ile işaretli ClaWT (5'-CGGGGTCTTCCGTCTT-3'), ClaR1 (5'-CGGGGTCTTCCCGTCTT-3'), ClaR2 (5'-CGGGGTCTTCCGTCTT-3') ve ClaR3 (5'-CGGGGTCTTGCCGTCTT-3') probları ile spesifik olarak hedeflenmiştir (Şekil 16) (29,133).



Şekil 16. Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) yönteminde *Helicobacter pylori* spesifik oligonükleotid problemleri (ClaWT, ClaR1, ClaR2, ClaR3)
* 29'uncu kaynaktan alınmıştır.

4.7.2. İnvaziv Olmayan Yöntemler

4.7.2.1. Üre Nefes Testi (ÜNT)

ÜNT invaziv olmayan testler içinde altın standart bir yöntemdir (19,20). Bu testin esas amacı *H. pylori* tarafından üretilen gastrik üreazın belirlenmesidir (12,133) Bu test organizmanın CO₂'yi sindirilmiş üreden ayrıştıran üreaz aktivitesi temel alınarak hazırlanmıştır. İşaretlenmiş ürenin yutulması bu reaksiyonda üretilen işaretli CO₂'nin nefeste belirlenmesi esasına dayanır (19,12). İki tipi vardır; Radyoaktif karbon ¹⁴C karbon izotopu ve stabil, non-radyoaktif ¹³C izotopu (30). ÜNT'nin tanı etkinliği %95'den fazla olduğu bildirilmiştir. ÜNT geçerli, pratik ve kolay okunabilir bir testtir (19).

Bu testin dezavantajı, maliyetinin yüksek olması ve pahalı ve özel enstrümentallere ihtiyaç duyulmasıdır (134-136). Buna karşılık bu testin avantajı kullanımı kolay olması ve özel transport koşullarına ihtiyaç duyulmamasıdır (134). ¹⁴C üre nefes testi ucuzdur, fakat radyoaktif bileşiklerin kullanılması özel ruhsat gerektirir ve bu testleri uygulayan personelin radyoaktif kimyasalların kullanımında eğitilmiş olmaları gereklidir. ¹³C üre nefes testi hiçbir radyasyon maruziyetine neden olmadığından örnekler için hiçbir özel işlem yapılması

gerekmez. Ayrıca gebe kadınlar ve çocuklar da güvenlik endişesi duyulmaksızın test edilebilir ve tekrar testleri de hiçbir sorun oluşturmaz (30). Ayrıca, ÜNT'nin spesifitesi genç çocuklarda azalmaktadır (137). Yapılan çalışmalarda altı yaşın altındaki çocuklarda ¹³C-ÜNT'nin spesifitesinin azaldığı rapor edilmiştir (138).

4.7.2.2. Serolojik Yöntemler

Serolojik testler pahalı olmayan ancak tanı etkinliği düşük (%80-84) bir non invaziv bir yöntemdir (19). PPI tedavisi invaziv ve invaziv olmayan testlerde yanlış negatif sonuçlar verebilir. PPI test yapılmadan en az dört hafta önce bırakılmalıdır Ancak bu durum serolojik testler için gerekli değildir. Serolojik testler kanamalı ülseri olan ve düşük bakteriyel dansite olduğu durumlarda önerilmektedir (19). Serolojik testlerin *H. pylori* enfeksiyonu izlenmesinde önemli bir role sahip değildir ve idrardan ve tükürükten spesifik *H. pylori* antikolarının saptanması da hasta takibinde önerilmemekte ancak epidemiyolojik çalışmalar için önerilmektedir (19).

4.7.2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

H. pylori enfeksiyonu kronik bir durumdur ve immunoglobulin G (IgG) (subtip 1 ve 4) çocuklarda da dominant immunoglobulindir. IgG mukozal düzeyde bulunur ve hemen hemen bütün kan örneklerinde saptanabilir. IgM nadir gözlenir, sadece çalışma yapılacak olan akut *H. pylori* enfeksiyonları için nadiren uygundur. Morris ve ark. enfeksiyonda ilk IgM yanıtı gözlenmiştir. IgA da enfeksiyon durumlarında yükselme gösterir ancak her zaman gözlenmez. Bu sebeple, IgM ve IgA antikoları ile ilişki sınırlıdır, ticari kitler ilk olarak anti- *H. pylori* IgG antikoru saptamak için tasarlanmıştır. IgG antikor düzeyi *H. pylori* eradikasyon tedavisinden sonra azaldığı bilinmektedir, fakat normal düzeye inmesi için aylar veya yıllar gerekebilir (20).

CagA antikolarını saptayan rekombinant proteinler kullanılarak tasarlanmıştır. Bu testler gastrik adenokarsinoma hastalarının serumlarında çalışıldığında, standart *H. pylori* ELISA testinden daha fazla pozitiflik bulunmuştur. Bu durum CagA'nın yüksek immunojenik molekül yapısına sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (20).

4.7.2.2. Westernblot

Yetişkinlerde *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için ELISA yöntemi yüksek doğruluğa sahipken çocuklarda çeşitli duyarlılık ve özgüllük görülmüştür. Western blot testi ise CagA ve VacA gibi virulans faktörlerini içeren spesifik *H. pylori* antijenlerine bağlanan antikörlerin direkt olarak görebilme olanağı sağlar. Bu proteinler yüksek immunojeniktir ve CagA için 118-136 kDa'luk ve VacA için 89 kDa'luk proteinlere karşı spesifik IgG immun yanıtını genellikle uyarırlar. Bu yüzden, bu test çocuklarda *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için daha kesin olduğu düşünülmekte ve muhtemelen virulan suşlar ile enfeksiyonun ayrılmasına olanak tanımaktadır (139).

4.7.2.3. Dışkı Örneklerinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

4.7.2.3.1. Dışkı Kültürü

Dışkıdan *H. pylori* kültürünün başarı oranı transport süresine bağlıdır. Thomas ve ark. geliştirmekte olan ülkelerdeki kötü beslenmiş çocukların dışkıları kullanılarak kısa transport süresi ile ilk kez dışkıdan kültür yönteminde başarı elde edilmiştir. *H. pylori* pozitif yetişkin gönüllüleri sodyum fosfat ile diyare oluşturularak yapılan çalışmada, Parsonnet ve ark. bu örneklerin % 50'sinde bakteri kültürü yapmayı başarmışlardır. Dore ve ark. ayrıca 12 hasta arasından üç *H. pylori* pozitif hastadan *H. pylori* izolasyonunu kültür ortamına önceden safrayırma ajanı olan kolestramin ekleyerek kültürde başarı sağladıklarını bildirmişler (20).

4.7.2.3.2. Dışkı Antijen Testleri

Dışkı örneklerinde *H. pylori* antijenlerinin belirlenmesi ilk kez 1997 yılında bildirilmiştir. Poliklonal ve monoklonal anti-*H. pylori* dışkı antijen testleri kullanılmaktadır. Megraud ve ark.; Kozak ve ark'larının *H. pylori* antijenlerini saptamak için poliklonal anti-*H. pylori* antikörleri ile kaplı mikro kuyucuklarda immun kompleksleri saptamak için peroksidaz ile konjuge edilmiş poliklonal antikörler kullanarak 100 erişkin dispeptik hastanın dışkı örneklerinde uyguladıkları ELISA testinin (HpSA, Meridian Diagnostic, Cincinnati, OH) duyarlılığını %88.8 ve spesifikliğini %94.5 olarak bildirmişlerdir. Avrupa'da 11 endoskopi ünitesi ile yapılan çok merkezli 500 hastanın değerlendirildiği çalışmada, ÜNT'nin duyarlılığı %95.3 ve spesifikliğini %97.7, dışkı antijen testinin duyarlılığı %94.1, spesifikliğini %91.8 olarak

saptanmıştır. HpSA'nın tedavi öncesi tanıdaki önemi çok sayıda çalışma ile konfirme edildiği bildirilmiştir. Ayrıca çok merkezli bir çalışmada bu testin *H. pylori* eradikasyon tedavisinin değerlendirilmesinde de yararlı olduğu bildirilmiştir. Perri ve ark. 4-6 haftalık postterapi alan 458 hastanın ÜNT ve HpSA sonuçlarını karşılaştırdıklarında hastaların % 8'inde tutarsız veya kuşkulu sonuçlar bildirmişlerdir. Monoklonal antikörlerin kullanıldığı Femtolab, Amplified-IDEA-HpStar ve Immunocard STAT HpSA testleri poliklonal antikörlerin kullanıldığı testlere göre sabit reaktif kalitesine sahiptir, testler arası değişikliklerden daha ziyade çok iyi üretilebilir özellikte ve elde edilen optik dansiteler belirgin olarak daha yüksektir (20).

Dışkı antijen testlerinin bazı kısıtlılıkları vardır. Bağırsak hareketlerinin etkisi henüz detaylı olarak çalışılmamıştır. Temelde kabızlık antijenin parçalanmasına neden olurken, önemli bir dilüsyon faktörü var olmadıkça, kısa bir geçiş zamanında değiştirilmemiş antijenin eliminasyonu söz konusudur. Deneysel örnekte en düşük konsantrasyon yalnızca 24 saat bekletilme sonrasında saptanamayabilir. Dışkı örneğinin mukolitik ajan *N*-asetil sistein ile muamele edilmesi testin duyarlılık ve spesifikliğini azaltmaktadır. Pozitif örneğin saptanması için cut-off değerinin belirlenmesi önemlidir. Bu testler oldukça spesifik olmasına rağmen, dışkıda nadir bulunan diğer *Helicobacter* türlerini de saptayabilmektedir (20).

Üst gastrointestinal kanama varlığında *H. pylori* enfeksiyonu tanısında, HUT ve ÜNT yalancı negatif sonuçlar verebilmektedir. Demiray ve ark. iki farklı monoklonal dışkı antijen testini (Rapid STRİP HpSA ve Simple *H. pylori* antijen kaset test) karşılaştırmışlar. Rapid STRİP HpSA testinin duyarlılığı %60, spesifikliğı %86, Simple *H. pylori* antijen kaset testinin duyarlılığı %33 ve spesifikliğı %86 saptanmıştır. Bununla birlikte Rapid STRİP HpSA testinin üst gastrointestinal sistem kanamalı hastalarda *H. pylori* enfeksiyonunun saptanmasında ve eradikasyon kontrolünde rutin tanı testi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (5).

HpSA non-invaziv diagnostik testler arasında tanı doğruluğu açısından her yaştaki hasta için uygulanabilir olan bir testtir. Çünkü ¹³C-ÜNT testinin çocuklarda spesifitesinin düşük olduğu aynı zamanda serolojik testlerin de çocuklarda sensitivitesinin düşük olduğu bilinmektedir. Böylece dışkı antijen testleri özellikle çocuklar için hem de epidemiyolojik çalışmalar için ön plana çıkmaktadır (137).

Maastrich III Sonuç raporuna göre, monoklonal dışkı antijen testinin duyarlılığı %91 ve spesifikliğı ise %93 olarak bildirilmiştir. Dışkı antijen testi birden fazla örnek test edildiği

zaman uygundur. Ancak, test hemen uygulanmayacaksa dışkı örnekleri -20°C 'de saklanmalıdır. Dışkı antijen testinin duyarlılığı dışkı 2-3 gün oda ısısında bekletildikten sonra %69'a düşmektedir. Seksen dokuz tane çalışmanın ele alındığı sistemik derlemede dışkı antijen testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 91 ve % 93 olarak bildirilmiştir. Ayrıca, tedaviden en az dört hafta sonra *H. pylori* eradikasyonunun değerlendirilmesinde, ÜNT önerilir ancak ÜNT'nin yapılamadığı durumlarda eradikasyon tedavisi takibinde monoklonal antikörlerin kullanıldığı dışkı antijen testlerinin kullanılması önerilmektedir (19).

Geleneksel HpSA testlerinde temel teknik ELISA (HpSA ELISA) yöntemidir. HpSA ELISA yüksek diagnostik etkinliği ile hem yetişkinlerde hem de çocuklarda uygulanmaktadır. Ayrıca, monoklonal anti-*H. pylori* antikörleri kullanılarak hızlı, beş dakika da sonuç alınabilen immunoassay (rapid HpSA test) dışkı antijen testleri geliştirilmiştir. Bu testin temel tekniği lateral akış gösteren immunokromatografi tekniğidir (138).

4.7.2.3.3. Dışkı PCR

1993 yılında ilk kez Mapsone ve ark. dışkıdan izole etikleri *H. pylori* DNA'sı ile PCR çalışmışlardır. Ancak, aynı başarıya Van Zwet ve ark. ulaşamamışlardır. Bu başarısızlığın nedeni hedef DNA'nın çok az miktarda bulunması ve polimeraz reaksiyonunu inhibe edecek maddelerin dışkı da bulunması olarak bildirilmiştir. Bu istenmeyen maddelerin elimine edilmesi için çok uzun, kompleks ve zor olan metotlar geliştirilmiştir (20).

Dışkı-PCR *H. pylori* enfeksiyonunun tanımlanması için kullanışlı bir metot olabilir ancak dışkıdan *H. pylori* DNA'sının elde edilmesinde başarı oranları % 25- %100 olarak rapor edilmiştir. Bu değişkenliğin gastrointestinal sistemde *H. pylori*'nin degradasyonu ve/veya kompleks polisakkaritler gibi inhibitörlerin varlığının neden olduğu düşünülmektedir (140). Ancak Şen ve ark. ise dispeptik hastalarda tek basamaklı PCR amplifikasyon yöntemi ile dışkıda *H. pylori* tanısının ve eradikasyon sonrasında dışkı PCR tekniğinin kullanılabileceğini bildirmişlerdir (141).

4.7.2.3.4. Dışkı Real Time PCR

Melting curve analizi ile biprobe real-time PCR kullanan Schabereiter-Gurtner ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar tanı için kullanılabileceğini bildirdiler ancak duyarlı ve dirençli suşlardan oluşan karışık popülasyona sahip örneklerden sadece duyarlı

suşların saptanabildiği bazı çalışmalarda ise hem *H. pylori* varlığı hem de üç nokta mutasyonunu da saptayan klaritromisin direncini göstermektedir (20,142,143). Dışkıdan PCR ile *H. pylori* ve klaritromisin direncinin belirlenebileceği ticari kitlerin geliştirilmesi tanı metodları için şüphesiz geçerli ve kullanışlı olacaktır. Ancak, duyarlılık ve özgüllük değerleri henüz daha belirlenmemiştir (20).

4.7.2.4. İdrar Antikor Testleri

İdrardan *H. pylori* antikoru için kullanılan immunoassaylerin *H. pylori* tanısı için önemli ve kullanışlı bir teknik olduğu, ayrıca, *H. pylori*'ye karşı idrar antikorlarının tespit edildiği ELISA testlerinin hem sensitivitesi hem de duyarlılığı bildirilmiştir (136). İdrardan IgG antikorlarının non-invaziv olarak belirlenmesi kan testleri ile belirlenen antikor testlerine karşı alternatif olabileceği düşünülmektedir. İdrar IgG URINELISA ve hasta başı kromatografik yöntemle idrar testleri (RAPIRUN) Japonya'da kullanılmış ve sonuçların olumlu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, hasta başı testleri Amerika ve Tayvan populasyonlarında yapılan çalışmalarda yüksek doğruluk bulunmuştur (143). Ancak, idrardan *H. pylori* antikorlarının belirleyen immunoassay metodu (URINELISA) Japonya'da kullanılmakta ve bu testin klinik yararı sınırlı olduğu bildirilmiştir. Neden olarak, hastaların ve *H. pylori* suşlarının farklı genetik yapıya sahip olmaları ile farklı antijen-antikor yanıtı oluşturdıklarından URINELISA sonuçlarını da etkilediği düşünülmektedir (144).

4.8. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunda Tedavi

H. pylori enfeksiyonu birinci basamak tedavisinde kullanılan ajanlar; klaritromisin, amoksisilin, PPI, metronidazol, tetrasiklin, bizmut olarak bildirilmiştir. Tüm dünyada en sık kullanılan üçlü tedavi FDA onaylı lansoprazol 30 mg, klaritromisin 500 mg ve amoksisilin 1 g'dır. Her biri 14 gün boyunca iki kere verilir. Alternatif değişkenler amoksisilin yerine metronidazol ve 14 günlük; klaritromisin (250 mg veya 500 mg), metronidazol (500 mg) ve bir PPI (omeprazol 20 mg veya lansoprazol 30 mg, günde bir kere veya iki kere) içeren günde iki kere uygulanan kombinasyondur (30).

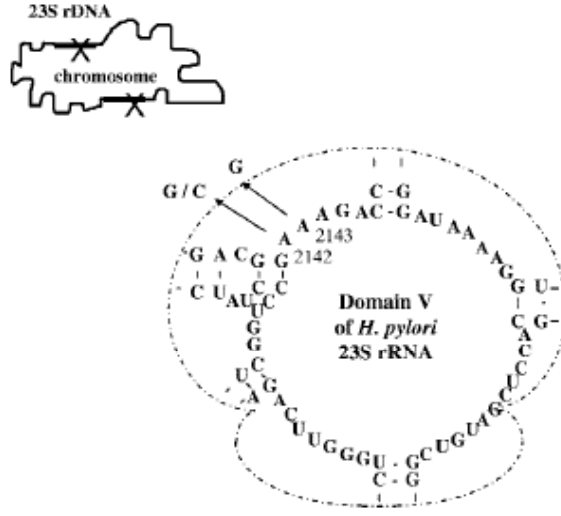
4.9. *Helicobacter pylori* Antimikrobiyal Direncin Moleküler Mekanizması

Güncel tedavi yöntemi PPI ve amoksisilin ve klaritromisin içeren iki veya daha fazla antibiyotik tedavisinden oluşur. Ancak, *H. pylori* antibiyotik direncinin artması halen daha büyümekte olan bir problemdir (145).

H. pylori, *Mycobacterium tuberculosis* gibi mutasyonlar ile direnç oluşumuna neden olmaktadır (Tablo 3). Direnç mekanizması horizontal olarak transfer olabilen plazmitler ile değil fakat vertikal olarak transfer olabilen nokta mutasyonlar ile gerçekleşir. Vertikal geçişin avantajı ise eğer midede aynı anda iki tane suş bulunduğunda transformasyonun gerçekleşebilir olmasıdır. Bu durum antibiyotik direnç oranının da artışa neden olmaktadır (20).

Birçok bakteride, ilaç “efflux” (çıkış) proteinleri antibiyotiklerin doğal tepkisine katkıda bulunur ve antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olur. 2000 yılında, *H. pylori* antibiyotik direnci ile varsayılan üç effluks sistemi arasında ilişkinin bulunduğu, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilerde genellikle tanımlanan sistemler olduklarının sonucuna varılmıştır. *H. pylori* amoksisilin dirençli suşlarda “effluks” mekanizmasının olmadığı bildirilmiştir. Antibiyotik direncinden ayrı olarak, *H. pylori* de “effluks” sistemi bakterinin gastrik çevrede adaptasyonu için önemli olan metal homeostatik oluşumunun devamı için önemli rol oynadığı bildirilmiştir (20).

Klaritromisin direnci Amerika’da % 5-14 ve Avrupa’da % 10’un üzerindeki oranlarda bildirilirken, ülkemizde oran % 17-56 arasında rapor edilmiştir (144). Klaritromisin dirençli *H. pylori* suşlarında 23S rRNA genlerinde genellikle mutasyonlar görüldüğü bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, 23S rRNA V domaininde üç nokta mutasyonu 2142 ve 2143 pozisyonunda Adenin-Guanine değiştiği ve VI domaininde 2717 pozisyonunda Timinin-Sitozine değiştiği nokta mutasyonlarının klaritromisin direncine neden oldukları gösterilmiştir (145). Ayrıca, T2182C mutasyonunun da klaritromisin direnci ile ilişkili olduğu önerilmiştir (146).



Şekil 17. *Helicobacter pylori* 23S rRNA domaininde gerçekleşen mutasyon ve klaritromisin direnci gelişimi

*20' inci kaynaktan alınmıştır.

Amoksisilin, *H. pylori* enfeksiyonu için kullanılan temel antimikrobiyal ajanlardan bir tanesidir. *H. pylori* amoksisilin direnci son zamanlarda artış göstermektedir ve bazı bölgelerde eradikasyon başarısızlığının temel nedenidir. Penisilin bağlayan protein 1 (PBP1)'in multiple mutasyonu sonucu *H. pylori* amoksisilin direnci oluşumuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. PBPs, C-terminal bölgesinde transpeptidaz bulunan peptidoglikan biyosentez enzimidir. Sırasıyla *pbp1*, *ftsI* ve *pbp2* tarafından kodlanan PBP1(HPO597), PBP2 (HP1556) ve PBP3 (HP1565) *H. pylori*'de yüksek moleküler ağırlıklı PBPs'ler olarak bildirilmiştir (147).

Makrolid ise 23S rRNA genindeki ribozomun bağlandığı peptidil transferaz bölgesine bağlanarak etkisini gösterir. *H. pylori* direnci nokta mutasyonları (2142 ve 2143) ile gerçekleşir. Tetrasiklin; ribozomun 30S altbirimine bağlanarak protein sentezini bloke eder. Tetrasiklinin hedef bölgesi ise iki *rrn* 16S operon bölgesidir. Florokinolon *gyrA* geni tarafından kodlanan DNA giraz'ın A altbirimini inhibe eder (Tablo 3) (20).

Tablo 3. *Helicobacter pylori*'de antimikrobiyal direnç gelişmesine neden olan nokta mutasyonları

Antibiyotikler	Genler
Makrolid	<i>rrn 23S</i>
Metronidazol	<i>rdxA, frxA</i>
Kinolon	<i>gyrA</i>
Rifampin	<i>rpoB</i>
Amoksisilin	<i>plpI</i>
Tetrasiklin	<i>rrn 16S</i>

* 20'inci kaynaktan alınmıştır.

4.9.1. Antimikrobiyal Direncin Genotiplendirilmesi

H. pylori enfeksiyonu tanımlaması için birçok yöntem vardır. Örneğin; serolojik testler hızlıdır, fakat anti-*H. pylori* antikoru tedaviden üç ile altı ay sonra da bulunabilir; bu nedenle aktif enfeksiyon ile geçmişte gelişmiş enfeksiyon ayrımı yapılamamaktadır. Gastrik biyopsi örneğinden yapılan HUT ise kesin bir tanı koyma yöntemi değildir, bu nedenle yardımcı test olarak düşünülmektedir. Kültür ve *H. pylori* izolasyonu spesifik bir metottur ve antibiyotik duyarlılık testi de uygulanabilir ancak dört ile yedi gün inkübasyon süresinden dolayı zaman alıcı bir yöntemdir. *H. pylori* antibiyotik duyarlılığı genellikle E-test, agar dilüsyon ve disk difüzyon gibi kültür temelli metotlar ile araştırılmaktadır. Antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) saptayan bu testler zaman alıcıdır ve sonuçlar değişkenlik gösterir (20,148). Histolojik inceleme, *H. pylori* tanımlaması için duyarlılığı ve spesifikliğı yüksek bir yöntem olmasına rağmen antibiyotik duyarlılığı ile ilgili bize bilgi vermez (20).

Bazı moleküler metotlar geliştirilmiştir. PCR metotları biyopsi örneğinden veya *H. pylori* suşlarının kültüründen veya dışkı örneklerine uygulanabilmektedir (149). Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ise tanı mikrobiyolojisinde hızlı ve spesifik bir yöntem olarak düşünülmektedir. Ribozomal RNA'ya bağlanan floresan işaretli oligonükleotitler

mikroorganizmaların direkt tanımlanması için FISH tekniğinde kullanılmaktadır (150). Bu test eş zamanlı olarak *H. pylori*'nin varlığının gösterilmesine ve klaritromisin direncinin saptanmasına olanak sağlamaktadır. DNA preparasyonuna gerek yoktur ve direk olarak gastrik biyopsi örneklerine uygulanabilir (148). Klaritromisin direncinin saptanabilmesi için çeşitli genotipik mutasyonlar geliştirilmiştir. Bunlardan esas kullanılan metotlar; PCR-RFLP ve real-time PCR'dır (Tablo 4) (20).

Tablo 4. *Helicobacter pylori* de makrolid direncinin saptanması için kullanılan genotipik metotlar

23S rRNA metot tipleri	Metot
Gen Amplifikasyonu ile	Sekans, pirosekans
	RFLP
	Oligonükleotit ligasyon assay
	DNA enzim immunoassay
	LİPA (INNO-LİPA)
	Preferential homoduplex formation assay
	3'-Mismatched PCR
	3'-Mismatched PCR Reverse PCR
	Real-time PCR
	Mikroelektronik chip array
	Elektrocatalytic detection
Gen amplifikasyonu olmadan	FISH

* 20'inci kaynaktan alınmıştır.

5. GEREK VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispeptik yakınmaları nedeniyle Kasım 2007-Ağustos 2009 tarihleri arasında başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 32 hasta ve retrospektif olarak 92 hasta olmak üzere toplam 124 hasta (89 kadın, 35 erkek; yaş ortalaması 47.8 ± 12.1 SD; yaş aralığı 19-83) çalışmaya alındı. Dispeptik hastalar Roma III Kriteri'ne göre belirlendi (Tablo 5) (151,152). Dispeptik hastalarda; koagülopati, gebelik, laktasyon, yakın zamanda kan transfüzyonu olan, gastrik cerrahi girişim geçiren, ciddi karaciğer hastalığı olan, son 6 ay içinde *H. pylori* eradikasyon tedavisi alanlar, son bir ay içinde NSAII, PPI ve antibiyotik kullanan hastalar dışlama kriterleri nedeniyle çalışmaya alınmadı. Endoskopi endikasyonu konulan tüm retrospektif ve prospektif hastalarla bizzat konuşulup çalışma hakkında bilgi verildi ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalara "Gönüllü Bilgilendirme Formu" okutulup imzaları alındı (EK-1). Öncelikli olarak endoskopi randevuları alındı. İşlemden önce ve işlem sırasında endoskopide uyulması gereken kuralları içeren bilgilendirme kağıdı ve endoskopi olacakları tarih endoskopi ünitesinden hastalara endoskopi ünitesi sekreteri tarafından temin edildi. Her hastaya bir numara verilerek "Gönüllü Bilgilendirme Formu", endoskopi raporu, patoloji raporları ve çalışma formları (EK 2) bir dosyada toplandı.

Tablo 5. Roma III çalışma grubuna göre fonksiyonel dispepsi ve altgruplarının tanımı

Fonksiyonel dispepsi tanımı
§ 12 ay içinde en az 12 hafta aralıklı ya da aralıksız olarak aşağıdakilerin varlığı
§ Üst abdomende sürekli ya da tekrarlayıcı ağrı ya da rahatsızlık, huzursuzluk varlığı
§ Bu semptomları açıklayacak organik neden olmaması
§ Defekasyonla rahatlama olmaması, dışkı sayısı ve formu ile ilişkisi olmaması
Dispepsi alt grupları
Ülser benzeri dispepsi
§ Üst abdomendeki ağrı predominanttır
Dismotilite benzeri dispepsi
§ Üst abdomende huzursuzluk predominanttır. Bu huzursuzluk, üst abdomende dolgunluk, erken doyma, şişkinlik, geğirme ve bulantıyı içerir
Tanımlanamayan dispepsi
§ Yukarıdakiler gibi tanımlanamayan tiptir

*151,152'inci kaynaktan alınmıştır.

i. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu 19 Haziran 2008 tarih ve 05/14/2008 nolu toplantısında 252/2008 protokol numaralı “*Helicobacter pylori* CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması” isimli yüksek lisans tezi araştırma projesinin uygulanması onayı 20.06.2008 tarih ve 256 sayılı yazı ile onayı alınmıştır (EK-3) ve 03 Temmuz 2008 tarih ve 31/15/2008 nolu toplantısında 252/2008 protokol numaralı “*Helicobacter pylori* CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması” isimli yüksek lisans tezi araştırma projesinin araştırmacı isim değişiklikleri Etik Kurul tarafından kabul edilerek onayı alınmıştır (EK-4).

5.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması

Çalışmaya katılan hastalara, en az sekiz saatlik açlıktan sonra Fujinon SN 2 GN20 A003 veya SN 1 GN20 A923 marka videoendoskopi ile üst gastrointestinal sistem (GIS) endoskopisi yapıldı. Endoskopi öncesi, endoskopi sırasında ve sonrasında hastalara bizzat refakat edildi. Endoskopi öncesinde %10'luk Xylocain pump sprey ile farinkse lokal anestezi uygulandı. Retrospektif hasta grubundan endoskopi sırasında mide antrum ve korpusundan dörder olmak üzere toplam sekiz, prospektif hasta grubundan ise üçer olmak üzere toplam altı biyopsi örneği alındı. Bir korpus ve bir antrum biyopsi örneğine endoskopi sırasında HUT uygulandı. Retrospektif tüm hasta grubunda bir korpus ve bir antrum örneği, prospektif hasta grubunda ise Uzman Endoskopist tarafından gerekli görüldüğü takdirde bir korpus ve/veya bir antrum örneği histopatolojik açıdan incelenmek üzere Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Diğer bir korpus ve bir antrum örneğine ise kültür ve biyopsi PCR yöntemi uygulanması için Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ulaştırıldı.

5.2.1. Hızlı Üreaz Testi (HUT)

Bir gram üre 10 ml steril distile suda eritilerek hazırlanan karışımdan her test tüpüne birer ml dağıtıldı (pH <8.1). Korpus ve antrum örnekleri üre solüsyonu içeren birer test tüpüne konuldu ve üzerlerine ikişer damla % 0.1'lik fenol kırmızısı solüsyonu eklenerek 0-10-15 dakika, 3-5 saat ve 24 saat içerisinde HUT sonucu değerlendirildi. Üreli solüsyon içerisindeki gastrik biyopsi örneği *H. pylori* ile enfekte ise bakterinin üreaz enzimi varlığında üre hidrolizi sonucunda açığa çıkan 2 NH₃ ve 2 CO₂ ile pH'sının değişmesi ile renk ve pH

indikatörü fenol kırmızısı üreli solüsyonda pembe renk değişiminin görülmesi (pH >8.1) pozitif, rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi.

i. Endoskopların Sterilizasyonu:

Endoskopların önce mekanik olarak temizliği su ile yıkanıp fırçalanarak, daha sonra %2'lik glutaraldehit içeren Fujinon Choyang otomatik yıkama makinesi ile 20 dakika yıkanması endoskopi ünitesinde yapılmakta ve su ile durulanıp kurutularak bir sonraki hasta için uzman endoskopist tarafından kullanılmak üzere hazırlanmaktadır.

5.2.2. Biyopsi Örneklerinin Histopatolojik İncelenmesi:

Retrospektif tüm hasta grubunda bir korpus ve bir antrum örneği, prospektif hasta grubunda ise Uzman Endoskopist tarafından gerekli görüldüğü takdirde bir korpus ve/veya bir antrum örneği histopatolojik açıdan incelenmek üzere hemen %10'luk formalin solüsyonu içeren şişelere alındı. Aynı ayrı şişelerde alınan bölgeler belirtilerek rutin histopatolojik inceleme istemi ile Patoloji Anabilim Dalı'na ulaştırıldı.

118 hastada; 92 retrospektif hastanın 91'inin antrum ve korpus toplam 182, 1'inin yalnızca antrum biyopsi örneği; 32 prospektif hastanın 17'sinin antrum ve korpus toplam 34, 9'unun yalnızca korpus biyopsi örneği olmak üzere toplam 226 biyopsi örneği gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından H&E, Alcian blue ve Giemsa boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon E600) morfolojik olarak incelendi. Lamina propria'da, pitlerde enflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi (IM) ve HPL her biri 0-3 arası olarak güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildi (124).

5.2.3. Hastaların Helicobacter pylori Enfeksiyonu Yönünden Değerlendirilmesi

Alınan her bir korpus ve antrum biyopsi örneklerine uygulanan histopatolojik inceleme, HUT ve kültürün, en az ikisinin pozitif olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu olumlu; tümünün olumsuz olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz kabul edildi. Ancak yalnızca HUT veya histopatolojik incelemeden birinin olumlu olduğu hastalar etik ve klinik yönden *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olarak değerlendirildiğinden, çalışmamızda da *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olarak değerlendirildi.

5.2.4. Biyopsi Örneklerinin Mikrobiyolojik İncelenmesi

5.2.4.1. *Helicobacter pylori* Kültür Protokolü

i. Besiyerlerinin Hazırlanması

%7 At Kanlı *Helicobacter pylori* Seçici Besiyeri:

§ Columbia Blood Agar	19.5 gr/ml	} 500 ml besiyeri için
§ Defibrine At Kanı	35 ml.	
§ <i>H. pylori</i> Selective Supplement (DENT)	1 vial	
§ Distile su	465 ml.	

Columbia Blood Agar (Oxoid) besiyerinden 19.5 gr 465 ml distile su içerisine ilave edildi ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 50°C’ye geldiğinde 35 ml steril defibrine at kanı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) ve 2 ml steril distile su içerisinde eritilen *H. pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid) besiyerine ilave edildi. Daha sonra besiyeri 90 mm petrilere aseptik koşullarda döküldü. Besiyerleri donduktan sonra kontaminasyon kontrolü için besiyerleri 24 saat etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek buzdolabında +4°C’de saklandı.

Transport besiyerinin hazırlanması:

Brucella Broth (Beckton Dickinson and Company) besiyerinden 2.8 gr 80 ml distile su içerisine eklendi ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavdan sonra gliserol solüsyonundan (Baked Analyzed) 20 ml eklendi. Steril ependorflara 1’er ml olacak şekilde alikotlandı ve buzdolabında +4°C’de saklandı.

%20 Gliserollü Stok besiyerinin hazırlanması:

Gliserol solüsyonu (%40) ve 40 ml Brain Heart Infusion (BHI) Buyyon (Beckton Dickinson and Company) 121°C’de 15 dakika ayrı ayrı otoklavlandı. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarları Seroloji Laboratuvarı’ndan serolojik olarak taranmış taze insan serumu filtre edilip 56°C’de 30 dakika su banyosunda inaktive edildi. Bu

besiyeri için hazırlananlar ve 10 ml steril taze insan serumu karıştırılarak steril ependorflara 1'er ml olacak şekilde alıktlandı. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

ii. Kültür Protokolünün Uygulanması

- § Endoskopi sırasında alınan bir antrum ve bir korpus gastrik biyopsi örnekleri % 20 Gliserollü Brucella broth içeren *H. pylori* transport besiyeri ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvara getirildi. Transport besiyeri içerisindeki gastrik biyopsi örnekleri aseptik koşullarda steril petrilere içerisine alındı ve biyopsi örnekleri steril bistüri veya doku homojenizatörü (Sigma Aldrich) ile ezilip parçalandı.
- § Parçalanmış biyopsi örneklerinin pasajı % 7 at kanlı Columbia Blood agar besiyerine yapıldı. Ekim yapılan plaklar 37°C'de 3-7 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik koşullarda enkübe edildi.
- § Kültür öncesi parçalanmış antrum ve korpus biyopsi örneklerinin her birinden bir kısım kültürle eş zamanlı olarak antrum ve korpus için ayrı ayrı Christensen's üreli agar besiyerine direkt biyopsiden üreaz testi için konuldu. Aynı zamanda direkt dokudan imprint preparat hazırlandı ve modifiye Gram boyaması ile boyandı. Doku hücrelerinin arasında *H. pylori* varlığı ve tipik morfoloji ışık mikroskopunda (Olympus, CX31 RTSF) 100X immersiyon objektifi ile incelendi.
- § Üreyen kolonilerin %7 at kanlı Columbia Blood agar besiyerine pasajlanarak subkültürleri yapıldı. Ayrıca enkübasyon sonrası üreyen *H. pylori* kolonilerinin direkt bakışı, katalaz, oksidaz, üreaz testleri ve modifiye Gram boyaması yapıldı. Gram (-) *H. pylori* varlığı ve tipik morfolojisi ışık mikroskopunda (Olympus, CX31 RTSF) 100X immersiyon objektifi ile incelendi.
- § Subkültürden üreyen *H. pylori* kolonileri %20 gliserollü BHI buyyon içeren stok besiyeri ile homojenize edilerek -80 °C'de saklandı.

*** Retrospektif olarak çalışmaya alınan 65 dispeptik yakınmalı hastanın korpus ve antrum biyopsi örnekleri New York Üniversitesi Veterans Affair Laboratuvarında uygulanan kültür protokolüne göre Prof. Dr. Özlem Yılmaz'ın diğer bir projesi kapsamında Prof. Dr. Guillermo I. Perez-Perez ve grubu tarafından daha önceden çalışılmıştır.

5.3. Serum Örneklerinin Alınması, Saklanması ve Yöntemlerin Uygulanması

Endoskopi ile eş zamanlı olarak her hastadan 10 ml venöz kan örneği alındı, ayrılan serum örnekleri 1.5 ml'lik steril burgulu kapaklı santrifüj tüplerine (Axygen SCT-150-C) üç adet olmak üzere paylaştırıldı. - 20 °C'de çalışılana kadar saklandı.

i. Anti-H. pylori IgG ELISA

Anti-*H. pylori* IgG antikorları, strain "Lior 1 (Brussels)"*H. pylori* suşundan elde edilen antijen ile kaplanmış mikrotitrasyon kuyucukları içeren ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck) testi ile araştırıldı.

Serum örnekleri örnek tamponu ile 1:101 oranında (10 µl serum 1.0 ml örnek tamponu) dilüe edildi, karıştırıldı. Kalibrasyon ve kontrol serumları kullanıma hazır olduğundan dilüe edilmedi.

ii. Anti- CagA IgG ELISA

Anti-*H. pylori* CagA IgG antikorları, tam uzunlukta bir protein olarak *E. coli*'de eksprese edilen cDNA karşılığı olan, rekombinant *H. pylori* CagA antijeni ile kaplanmış mikrotitrasyon kuyucukları içeren ELISA (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck) testi ile araştırıldı.

Serum örnekleri örnek tamponu ile 1:101 oranında (10 µl serum 1.0 ml örnek tamponu) dilüe edildi, karıştırıldı. Kalibrasyon ve kontrol serumları kullanıma hazır olduğundan dilüe edilmedi.

iii. Anti-H. pylori IgG ve anti- CagA IgG ELISA Test Prosedürü

Kalibrasyon serumları, pozitif ve negatif kontrol, dilüe edilmiş hasta serumları 100'er µl olmak üzere uygun kuyucuklara pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dk oda ısısında enkübasyona bırakıldı.

Kuyucuklar üç kez, 300'er µl yıkama tamponu (10X) ile yıkandı.

100 µl enzim konjugat (peroksidazla işaretli anti-insan IgG) her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 30 dk oda ısısında enkübasyona bırakıldı.

Yukarıdaki yıkama işlemi aynen tekrarlandı.

100 µl kromojen/substrat solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 15 dk oda ısısında, karanlıkta enkübasyona bırakıldı.

100 µl durdurma solüsyonu (0.5 M sülfürik asit) her kuyucuğa pipetlendi.

Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 30 dk içinde kuyucuklardaki renk yoğunluğu görsel ve 450 nm'de (620 nm referans dalga boyu olmak üzere) daha önceden kit üreticisinin önerdiği şekilde programlanmış olan "Organon Technica Microwell system" ELISA otomatik plak okuyucuda fotometrik olarak okutulup değerlendirildi.

Üretici firmanın tarafından belirtilen enfekte olmayan bireylerin normal referans değerlerinin üst sınır eşik değeri (cut-off değeri) 20 rölatif üniteler (RU)/ml, bu değer altındaki sonuçlar negatif, üzerindeki de pozitif kabul edildi. Pozitif ve negatif kontrol serumları her çalışmada internal kontrol olarak kullanıldı.

5.4. *Helicobacter pylori* DNA'sının Koloniden Ekstraksiyonu

5.4.1 Wizard Genomik DNA Purifikasyon Kiti Uygulaması (Promega)

Örneğin Hazırlanması:

Retrospektif olarak çalışmaya alınan 65 hastanın kültür pozitif suşlardan içerisinde 1 ml distile steril su veya PBS bulunan ependorf tüplerine steril eküvyon ile toplanan kolonilerden süspansiyon hazırlanarak DNA ekstraksiyon protokolüne göre diğer proje kapsamında DNA ekstraksiyonu New York Üniversitesi Veterains Affair Laboratuvarında daha önceden gerçekleştirilmiştir.

5.4.2. High Pure PCR Template Hazırlama Kiti Uygulaması (Roche)

H. pylori NCTC 11637 Standart Suşu ve Hastalardan İzole Edilen *H. pylori* suşlarının Hazırlanması:

%7 at kanı içeren taze hazırlanmış *H. pylori* Selective Supplement DENT (Oxoid) eklenmiş Columbia Blood Agar besiyerinde üreyen *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu ve kültür pozitif hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinin her birinden izole edilen *H. pylori* suşlarının kolonilerinden bir öze yardımı ile 5 ml PBS (Biochrom AG) içeren steril tüpte McFarland 2 (6×10^8 CFU/mL) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı,

otomatize Densimat (Biomérieux, France) cihazı kullanılarak McFarland 2 bulanıklığı saptandı.

DNA Ekstraksiyonu Protokolü:

1. Hazırlanan McFarland 2 (6×10^8 CFU/mL) bulanıklığında bakteri süspansiyonununun 200 μ l'si nükleaz içermeyen 1.5 ml mikrosantrifüj tüpünde (Greiner Bio-one) 3000 x g (~7000 rpm)'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet üzerine 200 μ l PBS eklendi. İyice karıştırıldı.
2. 5 μ l lizozim eklendi. 37°C'de su banyosunda 15 dakika enkübe edildi.
3. Su banyosunun sıcaklığı 70°C'ye çıkarıldı. Elüsyon tamponu kullanılmaya kadar 70°C'de su banyosunda bekletildi. 200 μ l bağlama tamponu ve 40 μ l Proteinaz K karıştırılarak bir karışım (240 μ l) hazırlandı. Bu iki maddenin önceden ayrı olarak karıştırılmasının nedeni homojenizasyonu tam olarak sağlamaktır. Daha sonra örnek üzerine hazırlanan bu karışım eklendi ve 70°C'de 10 dakika su banyosunda enkübe edildi.
4. Su banyosundan çıkan örnek üzerine 100 μ l isopropanol alkol ilave edildi ve karıştırıldı.
5. Altında toplama tüpü olan saflaştırma kolonuna tüm sıvı örnek eklendi ve kapağı kapatılarak 8000 x g (~12000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
6. Saflaştırma kolonunun üzerine 500 μ l inhibitör uzaklaştırma tamponu ortamdaki DNAaz gibi inhibitörleri uzaklaştırmak için eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 x g (~12000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
7. Saflaştırma kolonunun üzerine 500 μ l yıkama tamponu eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 x g (~12000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi.
8. Saflaştırma kolonunun üzerine 500 μ l yıkama tamponu eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 8000 x g (~12000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonunun altına yenisi yerleştirildi. Saflaştırma tüpünün kapağı kapatılarak kolonun daha iyi kuruması için 10 saniye son hız santrifüj edildi.
9. Saflaştırma tüpünün altına 1.5 ml hacimli ependorf tüpü yerleştirildi. Saflaştırma tüpünün üzerine 70°C'de tutulan elüsyon tamponun'dan 200 μ l eklendi ve kapağı kapatılarak

8000 x g (~12000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda saflaştırma tüpü atıldı. 1.5 ml ependorf tüpü içinde toplanan örnek ekstrakte edilen DNA'dır.

Ekstrakte edilen her bir DNA örneğinin miktarı Picodrop cihazı kullanılarak ölçüldü. Ekstrakte edilen DNA örneği +4°C'de saklandı. Örnekler daha sonra uzun süre saklanmak üzere çalışılincaya dek -20°C' ye kaldırıldı. Ayrıca, J99 *H. pylori* DNA'sı ise pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere Bordeaux France Helicobacter Campylobacter Referans Laboratuvarından temin edilmiştir.

5.5. *Helicobacter pylori* CagA EPIYA Motif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Uygulaması

5.5.1. Kullanılan malzemeler ve hazırlanmaları

1) 10 mM dNTP karışımı

A) dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'nin her birinden ayrı ayrı 400 µl alarak oluşturulan dNTP karışımı (Promega) 14,4 ml steril distile su içerisinde homojenize edildi. Hazırlanan karışım iyice karıştırıldı.

B) 10 µl dNTP (Sigma) karışımı (dNTP tüpü içerisinde her birinden 10 mM olarak: dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) 40 µl steril distile su içerisinde 1:5 oranında homojenize edildi.

2) Qiagen Taq DNA Polimeraz (250 units) (Qiagen) ve Taq DNA Polimeraz (500 units) (Fermentas)

Kullanıma hazır olarak temin edildi.

3) Primerler (HPLC saflıkta)

***ureA* (411 bp)**

HPU-1; 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3' (forward primer)

HPU-2; 5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3' (reverse primer) (TıbMolBiol) (141)

cagA (370-570 bp)

cagA2530S; 5-GTTAARAATRGTGRAAYGG-3 (forward primer)

cagA3000AS; 5-TTTAGCTTCATACGC-3 (reverse primer) (Sigma) (7)

Liyofilize primerler, kalite belgesindeki belirtilen oranlarda, HPU-1: 491 µl, HPU-2: 589 µl, cagA2530S: 881 µl, cagA3000AS: 886 µl, steril, nükleaz içermeyen de-iyonize distile su (ultra pure water for HPLC Biochrom AG) (pH 7) ile sulandırıldı.

Hazırlanan bu stok solüsyondan 20 µl alıp, 180 µl distile su ile karıştırılarak karışım hazırlandı. Öncüller bittiğinde aynı işlem ana stoktan tekrarlandı.

4) (A) 50 bp Ikb ladder (İnvitrogen): 175 µl DNA marker, 2.5 ml 10X TAE ve 1 ml 6x loading buffer karıştırılarak hazırlandı.

(B) GeneRuler™ 50 bp DNA ladder (50µg) (Fermentas #SM0371): 5 µl DNA Ladder,

5 µl 6x loading dye ve 20 µl distile su karıştırılarak hazırlandı.

5) Agaroz (500 g) (Crystalgen) ve **Seakem® LE Agaroz** (Lonza,USA)

6) Etidium bromid (10 mg/ml) (BIO-RAD, Cat No: 161-0433) ve (Sigma)

0.1 gr etidium bromid 10 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

7) TBE 10X tamponu (Applichem)

20 ml TBE 10X solüsyonu ve 980 ml distile su karıştırılarak 1X TBE tamponu elde edildi.

8) 6X Orange DNA Loading dye (Fermentas #RO631)

5.5.2. DNA'nın çoğaltılması (Amplifikasyon)

1) Amplifikasyon için PCR Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için 0.2 ml'lik ependorf tüpüne (Greiner bio-one) toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu; işlemler sırasında malzemeler ve ependorf tüpleri buz üzerinde tutuldu.

HPU PCR

Steril distile su	32 µl
10X PCR Tamponu*	5 µl
dNTP	5 µl
HPU-1	1 µl
HPU-2	1 µl
Fermentas Taq DNA Polimeraz*	1 µl
MgCl ₂	4 µl
DNA kalıbı	1 µl

*Fermentas Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu; MgCl₂ içermemektedir. Qiagen Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu: MgCl₂ içerdiğinden ilave edilmemiştir (Her iki Taq DNA Polimerazda PCR reaksiyonunda kullanılmıştır).

cagA PCR

Steril distile su	37.75 µl
10X PCR Tamponu*	5 µl
dNTP	4 µl
cagA-2530S	1 µl
cagA3000AS	1 µl
Qiagen Taq DNA Polimeraz*	0.25 µl
DNA kalıbı	1 µl

* Qiagen Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu: MgCl₂ içerdiğinden ilave edilmemiştir. Fermentas Taq DNA Polimeraz enziminin 10X PCR tamponu; MgCl₂ içermemektedir (Her iki Taq DNA Polimerazda PCR reaksiyonunda kullanılmıştır).

*Pozitif kontrol olarak NCTC 11637 ve J99 standart *H. pylori* suşları kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

5.5.3. Termal Cycluser PCR Programı

Her bir örnek ve negatif kontrol için hazırlanmış olan küçük PCR ependorf tüpleri termal cycluser'a (Thermo Hybaid MBS 0.55) ve (Techne TC-412) yerleştirildi. Tüm amplifikasyon işlemleri aynı cihazda yapıldı.

HPU PCR için;

Başlangıç aktivasyon basamağı: 95 °C'de 3 dakika

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C	1 dakika
Primer bağlanması (Annealing)	45 °C	1 dakika
DNA zincirinin uzaması (Elongasyon)	72 °C	1 dakika
Son uzama (Son Elongasyon)	72 °C'de	10 dakika

cagA PCR için;

Başlangıç aktivasyon basamağı: 94 °C'de 5 dakika

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C	30 saniye
Primer bağlanması (Annealing)	50 °C	45 saniye
DNA zincirinin uzaması (Elongasyon)	72 °C	45 saniye
Son uzama (Son Elongasyon)	72 °C'de	5 dakika

5.5.4. Agaroz Jel Hazırlama

PCR ürünlerinin saptanması için 1X TBE içerisinde % 1-1,5'lik agaroz jel hazırlandı. 100 ml 1X TBE tamponu içine 1-1,5 gr agaroz tartılarak konuldu. Mikrodalga fırında 350 Watt'da 1.5 dakika tutularak eritildi. Karışımın sıcaklığı 60°C'ye düştüğünde 7 µl etidyum bromid (BIO-RAD, Cat No: 161-0433) eklendi. Elektroforez tankının jel kalıbı distile suyla silinip temizlendi ve kenarları sızdırmayacak şekilde tank içine yerleştirildi, jel kalıbın tarağı yerleştirildi. Hazırlanan jel karışımı kalıba döküldü. Donması beklendi. Donduktan sonra jel kalıbının şekli değiştirildi ve tarak çıkartıldı.

5.5.5. Elektroforez

Büyüklik belirleyici olarak kullanılan "DNA ladder" ve incelenecek PCR ürünlerinden 10'ar µl olacak şekilde parafilm üzerine aktarıldı. Her örnek için birer µl olmak üzere "loading dye" yükleme tamponu eklendi, karıştırıldı. Her birinden 10'ar µl alarak jele aktarıldı. 1 X TBE içinde 120 volt'da (Fisher Scientific FB300) (Thermo Scientific Owl Easycast™ B2) 20 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde (EAGLE EYE II ve VILBER LOURMAT) Infinity Capt programı kullanılarak incelendi. PCR ürünü büyüklükleri DNA ladder ile karşılaştırıldı.

5.6. Sekans Analizi için PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Jelde görüntülenen PCR ürünleri QIAquick® PCR Pürifikasyon kiti (Qiagen, Cat No: 28106) kullanılarak sekans analizi için pürifikasyon aşaması gerçekleştirildi.

i. QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)

PE tamponu kullanılmadan önce etanol (Ultrapure, Cat No: 800-424-9300 ve Applichem molecular biology grade A3678,1000) eklenerek hazırlanmıştır ve bütün santrifüj işlemleri Beckman Coulter TM Microfuge 18 Centrifuge ve Hettich Mikro 120 (Germany) kullanılarak 13000 rpm'de gerçekleştirilmiştir.

- 1- PCR ürünlerimize 200 µl PB tamponu eklendi ve karıştırıldı.
- 2- Hazırlanan bu karışım QIAQuick spin kolonlarına aktarıldı.

- 3- DNA'nın bağlanması için, PCR ürünlerini içeren QIAquick spin kolonları 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
 - 4- Santrifüj sonrası spin kolonlarının altında kalan sıvı atıldı ve tekrardan spin kolonunun altına yerleştirildi.
 - 5- Yıkama aşaması için, 0,75 ml (750 µl) PE tamponu QIAquick spin kolonuna eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi.
 - 6- Tekrardan altta kalan sıvı atıldı ve spin kolonunun altına yerleştirildi. 1 dakika santrifüj edildi.
 - 7- QIAquick spin kolonu temiz 1,5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
 - 8- DNA'yı ayrıştırmak için, 50 µl EB tamponu QIAquick membranın ortasına gelecek şekilde konuldu ve kolon 1 dakika santrifüj edildi.
- 1,5 ml ependorf tüpünde kalan pürifikasyonu yapılmış PCR ürünümüz sekansa gönderilene kadar -20 °C'de saklandı.

5.7. Sekans Analizi

cagA pozitif hasta antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinden izole edilen kolonilerinden elde edilen *H. pylori* suşlarının ve standart *H. pylori* NCTC 11637 ve J99 standart suşlarının pürifiye DNA ürünleri "MacroGen, (Güney Kore) (www.macrogen.com)" firmasına gönderilerek sekans analizi yapıldı. Sekans sonuçları SEQUENCER 4.7, CLUSTALX 1.81 ve GENEDOC software programları kullanılarak analiz edildi ve bu sekans sonuçlarına göre EPIYA motifleri belirlendi.

5.8. Filogenetik Analiz

H. pylori CagA filogenetik analiz için bütün sekans sonuçları Mega 4.0.2 software kullanılarak analiz edildi (www.megasoftware.com)

5.9. İstatiksel Değerlendirme

Alınan her bir korpus ve antrum biyopsi örneklerine uygulanan histopatolojik inceleme, HUT ve kültürün, en az ikisinin pozitif olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; tümünün olumsuz olduğu olgular *H. pylori* enfeksiyonu negatif kabul edildi. Kategorik verilerin analizi (atrofi, enflamasyon, IM vb histopatolojik sınıflandırma ile *cagA*'nın pozitif/negatifliğinin karşılaştırılması) için dört gözlü tablo oluşturuldu ve Epiinfo test (version 3.5.1) ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Demografik veriler için *t* testi kullanıldı.

a: Doğru olumlu

b: Yalancı olumlu

c: Yalancı olumsuz

d: Doğru olumsuz

Duyarlılık = $a/(a+c) \cdot 100$

Seçicilik = $d/(b+d) \cdot 100$

Olumlu öngörü değeri = $a/a+b \cdot 100$

Olumsuz öngörü değeri = $d/c+d$

Olabilirlik oranı = Duyarlılık / (1-Seçicilik)

Tanısal Doğruluk = $a+d/a+b+c+d$

Tanısal yöntemler ile altın standart yöntemlerin karşılaştırılmasında duyarlılık, seçicilik, olumlu ve olumsuz öngörü değeri ve tanısal doğruluk kullanıldı. McNemar Ki-kare testi uygulandı (SPSS Version 11.0 for Windows).

Histopatolojik tanı ve bulguların değerlendirilmesinin; altın standart yöntemler ile ve ayrıca *CagA* pozitifliği/negatifliği ve EPIYA tipleri ile ilişkisinin varlığı Mann Whitney U testi ile değerlendirildi (SPSS Version 11.0 for Windows).

6. BULGULAR

6.1. Demografik Bulgular

Dispeptik yakınmaları nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan 35 erkek (%28.2) ve 89 kadın (%71.8) toplam 124 olgunun yaş aralığı 19-83 ve SD ise 47.8 ± 12.1 olarak saptandı. Dispepsi tanısı Roma III Kriterlerine göre değerlendirildi.

H. pylori enfeksiyonu olumluluğu ile kadın ve erkek cinsiyeti arasında anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 testi, $p=0,169$). *H. pylori* enfeksiyonu olumluluğu ile yaş arasında anlamlı bir fark bulundu (t test, $p=0,039$). *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olan hastalarda yaş ortalaması 46.4 ± 11.6 saptanırken, *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olan hastalarda yaş ortalaması 51.4 ± 12.5 saptandı.

6.2. HUT ve Histopatoloji Sonuçları

H. pylori enfeksiyonu tanısında kullanılan invaziv yöntemlerden olan HUT ve histopatolojik inceleme sonuçları her bir hastanın antrum ve korpus HUT, antrum ve korpus histopatolojik inceleme sonuçlarına göre değerlendirildi.

Çalışmadaki 124 hastadan 80 (%64.5)'i *H. pylori* enfeksiyonu yönünden antrum ve/veya korpus HUT olumlu; bunların 80'inin 52 (%65)'si antrum ve korpus HUT olumlu, 20 (%25)'si antrum HUT olumlu, sekiz (%10)'i korpus HUT olumlu saptanırken 44 (%35.5)'ü antrum ve korpus HUT olumsuz saptandı.

Histopatolojik incelemede toplam 118 hastanın 78 (%66.1)'i *H. pylori* enfeksiyonu yönünden antrum ve/veya korpus olumlu; bunlardan 57 (%73.1)'si antrum ve korpus olumlu, 11 (%14.1)'i antrum olumlu, 10 (%12.8)'u korpus olumlu saptanırken, 40 (%33.9)'ü antrum ve korpus olumsuz saptandı. (Toplam 124 hastadan altı hastanın antrum ve korpus biyopsi örneği endoskopist gerekli görmediği için Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilmediğinden değerlendirmeye alınmadı).

118 hastada; 92 retrospektif hastanın 91'inin antrum ve korpus toplam 182, bir hastanın yalnızca antrum biyopsi örneği; 32 prospektif hastanın 17'sinin antrum ve korpus toplam 34,

dokuz hastanın yalnızca korpus örneği olmak üzere toplam 226 gastrik biyopsi örneği Patoloji Anabilim Dalı'nda gastrointestinal patoloji ile ilgili patoloji uzmanı tarafından gastrik aktivite açısından; lamina propiada, pitlerde enflamasyon, atrofi, intestinal metaplazi ve HPL her biri 0-3 arası olarak güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre incelendi.

118 dispeptik hastada, altın standart yöntemler ile antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinde pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) ve lamina propiada enflamasyon (kronik gastrit) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Mann Whitney U, $p=0.000$). Ayrıca, 118 hastanın patoloji raporlarındaki tanı göz önüne alındığında, altın standart yöntemler ile antrum ve korpus aktif kronik gastrit arasında anlamlı fark saptandı (χ^2 testi, $p=0.000$).

Tablo 6. Kültür negatif 62 dispeptik hastada 27 histopatoloji ve/veya HUT pozitif veya negatifliği ile 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz (enfekte olmayan) hastada histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki

Kültür Negatif (n=62)	Hasta No	Histopatolojik Tanı*		Histopatolojik Değerlendirme*												
		Antrum	Korpus	Antrum						Korpus						
				Atrofi	IM	Aktif Pileerde Enflamasyon	Kronik Gastrit Lamina Propriada Enflamasyon	HPL	Atrofi	IM	Aktif Pileerde Enflamasyon	Kronik Gastrit Lamina Propriada Enflamasyon	HPL			
Kültür Negatif Histopatoloji ve/veya HUT pozitif hasta (n=27)	1	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	1	0	2	2	0	0	1	0	1	0	1	2	3
	6	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	3	0	0	0	0	3	0	3	3	2
	10	hafif düzeyde kronik gastrit	normal	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	reaktif gastrit	kronik gastrit	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
	16	minimal kronik inflamasyon	minimal kronik inflamasyon	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	23	aktif kronik gastrit	hafif düzeyde kronik gastrit	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	28	hafif düzeyde kronik gastrit	normal	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

36	kronik gastrit	orta şiddette atrofi kronik gastrit	0	0	1	2	0	2	0	0	1	2	0	2
37	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	1	2	2	2	0	1	0	0	2	0	2
45	kronik gastrit, fokal hafif atrofi	kronik gastrit, endokrin hücre hiperplazisi	1	0	1	2	1	0	1	2	3	0	0	0
49	reaktif gastropati	hafif düzeyde kronik enflamasyon ve atrofi	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
58	kronik gastrit	hafif enflamasyon	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
81	şiddetli aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	0	2	0	0	1	0	1	0	1
83	normal	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	yüksek dereceli displazi, aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	3	2	2	2	0	0	1	2	0	0	3
91	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	3	3	2	0	1	1	2	0	0	3
94	hafif inflamasyon	hafif enflamasyon	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
102	reaktif faveolar değişiklikler	normal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
110	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit orta şiddette atrofi	2	0	2	1	1	1	2	0	1	1	2	2
126	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	0	0	0	2	3	0	0	3
E1 **	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	3	3	0	0	3	3	0	0	3

Kültür Negatif Histopatoloji Negatif HUT Negatif Enfekte olmayan hasta (n=35)													
E6 **	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	3	3	0	0	1	3	3	3
E8	X	kronik gastrit	X***	X	X	X	X	0	0	0	1	1	1
E16	X	kronik gastrit	X	X	X	X	X	0	0	0	1	0	0
E17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E19 **	X	kronik gastrit	X	X	X	X	X	0	0	1	3	2	2
E22	X	aktif kronik gastrit	X	X	X	X	X	0	2	1	2	1	1
2	hafif düzeyde atrofi gösteren mukoza	ödemi	1	0	0	1	0	3	0	0	1	0	0
4	normal	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	reaktif gastropati	normal	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
22	hafif düzeyde kronik gastrit	normal	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25	aktif kronik gastrit	ödemi	1	0	1	2	0	Y****	Y	Y	Y	Y	Y
27	kronik gastrit	normal	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
33	hafif atrofik kronik gastrit	hafif enflamasyon	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
34	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	1	1	2	0	0	1	1	2	2	0

38	kronik gastrit	şiddetli atrofi kronik gastritün endokrin hücre hiperplazisi	0	2	0	1	0	3	2	1	2	0
40	hafif kronik enflamasyon	kronik gastrit	1	3	1	1	0	2	3	1	1	0
46	normal	kronik gastrit	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
48	intestinal metaplazi	normal	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
50	düşük dereceli displazi ve kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0
56	kronik gastrit	hafif inflamasyon kronik gastrit	1	0	1	2	0	0	1	1	1	0
59	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
61	reaktif gastrit	normal	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
62	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
77	normal	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	hafif kronik enflamasyon	hafif enflamasyon	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
100	aktif kronik gastrit	kronik gastrit ve hafif atrofi	0	0	1	1	0	1	0	0	2	0

108	kronik gastrit	minimal nonspesifik kronik enflamasyon	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
133	normal	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3	X	kronik gastrit	X	X	X	X	X	0	0	0	1	1	0
E4	atrofik kronik gastrit	normal	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
E5	X	minimal kronik enflamasyon	X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	0
E7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E9	normal	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E11	X	normal	X	X	X	X	X	0	0	0	0	1	0
E12	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
E14	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
E18	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
E20 **	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E21	X	hafif düzeyde kronik gastrit	X	X	X	X	X	X	X	0	0	1	0
E23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

*Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilmiştir. Yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3); ** E1,E6,E19 ve E20 kültürde kontaminasyon olduğundan negatif değerlendirildi. *** E3,E5,E7,E8, E10,E11,E16, E17,E19,E20,E21 ve E23 kültür yapılmış ancak antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri histopatolojik incelemeye gönderilmemiştir (X). ****Y; doku yetersiz olduğundan değerlendirilemedi.

6.3. *Helicobacter pylori* Kültür Sonuçları

H. pylori enfeksiyonu tanısında altın standart yöntem olan kültür Maastricht III 2005 Konsensus raporuna (19) göre o toplumun veya popülasyonda klaritromisin direnci %15-20'den yüksek ve iki tedavi başarısızlığından sonra kültür önerilmekte ise de çalışma grubumuzdaki 124 hastanın hepsinin korpus ve antrum biyopsi örneklerinin kültürü yapıldı. Kültür sonuçları mikrobiyolojik açıdan değerlendirilerek *H. pylori* enfeksiyonu tanısında altın standart yöntem olarak yer aldı.

Altın standart yöntem olan kültüre göre, 124 hastanın 62 (%50)'si *H. pylori* kültürü olumlu; bunlardan 45 (%72.6)'i antrum ve korpus olumlu, 10 (%16.1)'u antrum olumlu, 7 (%11.3)'si korpus olumlu ve 62 (%50)'inin *H. pylori* kültürü olumsuz saptandı [Bunlardan 4 (%6.5)'ünün sonucu kontaminasyon nedeni ile *H. pylori* kültür olumsuz olarak değerlendirildi].

Sonuç olarak 124 hastadan 76 (%61.3)'sı kültür, HUT ve histopatolojik değerlendirmenin en az ikisi olumlu olduğundan *H. pylori* enfeksiyonu olumlu; ancak yalnızca HUT veya histopatolojik incelemeden birinin olumlu olduğu 13 (%10.5) hasta klinik yönden *H. pylori* enfeksiyonu olumlu olarak değerlendirildiğinden toplam 89 (%71.8) hasta *H. pylori* enfeksiyonu olumlu, 35 (%28.2)'i *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz olarak değerlendirildi.

Klaritromisin duyarlılık testinde fenotipik yöntemlerden E-test yönteminin yanı sıra kültürden bağımsız olarak tüm enfekte olan ve olmayan hastalarımız için floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi uygulanarak değerlendirilmiştir. 124 dispeptik hastamızın klaritromisin duyarlılığının EPIYA Motifleri ile ilişkisinin değerlendirilmesi için FISH yöntemi ile *H. pylori* varlığı ve klaritromisin duyarlılık bulguları devam etmekte olan 2006.KB.SAG.042 proje numaralı doktora tez projesinden danışman Prof. Dr. Özlem Yılmaz'ın onayı ile bu tez projesinde veriler değerlendirilmiştir.

124 hastada, *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliği ile antrum ve korpus klaritromisin duyarlı ve dirençli suşlar arasında anlamlı fark saptanmadı (Fisher Exact Test, antrum için $p=0,317$; korpus için $p=0.565$).

Tablo 7. Kültür negatif 62 dispeptik hastada 27 histopatoloji ve/veya HUT pozitif veya negatifliği ile 35 *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz (enfekte olmayan) hastada histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki

Kültür Negatif (n=62)	Hasta No	Cinsiyet	Histopatolojik Tanı*		Klartromisin duyarlılığı	
			Antrum	Korpus	Antrum	Korpus
Kültür Negatif Histopatoloji ve/veya HUT Pozitif (n=27)	1	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	- **	Duyarlı
	6	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	10	K	hafif düzeyde kronik gastrit	normal	-	-
	14	K	reaktif gastrit	kronik gastrit	-	-
	16	K	minimal kronik inflamasyon	minimal kronik inflamasyon	Y***	Y
	23	K	aktif kronik gastrit	hafif düzeyde kronik gastrit	-	Duyarlı
	28	K	hafif düzeyde kronik gastrit	normal	-	-
	36	K	kronik gastrit	orta şiddette atrofi kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	37	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
	45	K	kronik gastrit, fokal hafif atrofi	kronik gastrit, endokrin hücre hiperplazisi	-	-
	49	K	reaktif gastropati	hafif düzeyde kronik inflamasyon ve atrofi	-	-
	58	K	kronik gastrit	hafif inflamasyon	-	-
	81	K	şiddetli aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Dirençli
	83	K	normal	normal	-	-

89	E	yüksek dereceli displazi, aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	-	Duyarlı
91	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	-	Duyarlı
94	K	hafif inflamasyon	hafif inflamasyon	hafif inflamasyon	Duyarlı	-
102	E	reaktif faveolar değişiklikler	reaktif faveolar değişiklikler	normal	-	-
110	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit orta şiddette atrofi	-	Duyarlı
126	K	kronik gastrit	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	-	Duyarlı
E1****	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	X	X
E6****	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	X	X
E8	K	X	X	kronik gastrit	X	Y
E16	E	X	X	kronik gastrit	X	Y
E17	E	X	X	X	X	X
E19****	K	X	X	kronik gastrit	X	Y
E22	E	X	X	aktif kronik gastrit	X	Y
2	K	hafif düzeyde atrofi gösteren mukoza	hafif düzeyde atrofi gösteren mukoza	ödemli	-	-
4	K	normal	normal	normal	Duyarlı	Duyarlı
17	E	reaktif gastropati	reaktif gastropati	normal	-	-
22	K	hafif düzeyde kronik gastrit	hafif düzeyde kronik gastrit	normal	-	-
25	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	ödemli	Y	Y
27	K	kronik gastrit	kronik gastrit	normal	-	-
33	K	hafif atrofik kronik gastrit	hafif atrofik kronik gastrit	hafif inflamasyon	-	-
			Kültür Negatif Histopatoloji			
			Negatif HÜT negatif Enfekte			
			olmayan hasta (n=35)			

34	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	-	-
38	E	kronik gastrit	şiddetli atrofi kronik gastritin endokrin hücre hiperplazisi		-	-
40	E	hafif kronik enflamasyon	kronik gastrit	kronik gastrit	-	-
46	K	normal	kronik gastrit	kronik gastrit	-	-
48	E	intestinal metaplazi	normal	normal	-	-
50	K	düşük dereceli displazi ve kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
56	K	kronik gastrit	hafif inflamasyon kronik gastrit		-	-
59	E	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	-	-
61	E	reaktif gastrit	normal	normal	-	-
62	E	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
77	K	normal	normal	normal	-	-
98	E	hafif kronik enflamasyon	hafif enflamasyon		-	-
100	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit ve hafif atrofi		-	-
108	K	kronik gastrit	minimal nonspesifik kronik enflamasyon		-	-
133	K	normal	normal	normal	Y	Y
E3	K	X****	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
E4	K	atrofik kronik gastrit	normal	normal	Y	Y
E5	E	X	minimal kronik enflamasyon		X	Y
E7	K	X	X	X	X	X

E9	K	normal	normal	Y	Y
E10	K	X	X	X	X
E11	E	X	normal	X	Y
E12	K	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
E14	E	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
E18	E	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
E20*****	K	X	X	X	X
E21	K	X	hafif düzeyde kronik gastrit	X	Y
E23	E	X	X	X	X

*Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilmiştir.; ** (-) Parafine gömülü formalin fikse biyopsi kesitinde FISH sonucu antrum ve/veya korpus *H. pylori* varlığı gözlemlenmedi. *** Y; yapılamadı.; **** E3,E5,E7,E8, E10,E11,E16, E17,E19,E20,E21 ve E23 kültür yapılmış ancak antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri histopatolojik incelemeye gönderilmemiştir (X). ***** E1,E6,E19 ve E20 kültürde kontaminasyon olduğundan negatif değerlendirildi.

6.4. *Helicobacter pylori* Seroloji Sonuçları

i. Anti-H. pylori IgG (ELISA) Sonuçları

Çalışmaya alınan 123 hastanın 95 (%77.3)'i anti-*H. pylori* IgG antikorları olumlu saptandı. Altın standart yöntemlere göre, 89 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastanın; 77 (%86.5)'si anti-*H. pylori* IgG antikoru olumlu, 11 (%12.4)'i olumsuz saptandı ve 1 (%1.1) hasta çalışılmadı. *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz 35 hastanın, 17 (%48.6)'si anti-*H. pylori* IgG antikoru olumlu, 18 (%51.4)'i olumsuz saptandı.

Anti-*H. pylori* IgG ELISA testinin duyarlılığı %87.5; seçiciliği %51.4, PPV %81.9, NPV %62.1 saptandı (kappa (κ) = 0,410).

ii. Anti-CagA IgG (ELISA) Sonuçları

Çalışmaya alınan 123 hastanın 36 (%29.3)'sı anti-CagA IgG antikoru olumlu, 87 (%70.7)'si olumsuz saptandı. Altın standart yöntemlere göre, 89 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastanın 28 (%31.5)'i anti-CagA IgG antikoru olumlu, 60 (%67.4)'i olumsuz saptandı ve 1 (%1.1) hasta çalışılmadı. *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz 35 hastanın ise 8 (%22.9)'i anti-CagA IgG antikoru olumlu, 27 (%77.1)'si olumsuz saptandı.

Altın standart olarak *cagA* PCR sonuçlarına göre değerlendirildiğinde; 30 *cagA* pozitif hastada 14 (%46.6)'ü anti-CagA IgG antikoru olumlu, 32 *cagA* negatif hastada 6 (%18.8)'sı anti-CagA IgG antikoru olumlu saptandı. Anti-CagA IgG ELISA testinin duyarlılığı %46.7; seçiciliği %80.7, PPV %70.0, NPV %61.0 saptandı (kappa (κ) = 0,275).

6.5. *Helicobacter pylori cagA* PCR Sonuçları

H. pylori kültür pozitif hastaların DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. *H. pylori* kültür pozitif antrum ve korpus 45 (%72.6), yalnızca antrum 10 (%16.1) ve yalnızca korpus 7 (%11.3) toplam 62 klinik izolatın DNA'ları New York Üniversitesi Veterans Affairs Laboratuvarında ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çalışılmıştır.

Çalışmaya alınan 124 hastadan 62 (%50)'si kültür olumlu, 62 (%50)'si kültür olumsuz saptandı. Kültür pozitif saptanan 62 hastanın, 30 (%48.4)'u *cagA* pozitif ve 32 (%51.6)'si *cagA* negatif olarak saptandı.

Kültür negatif 62 (%50) hastanın, 27 (%43.5)'sinde HUT ve/veya histopatoloji pozitif veya negatifliği varlığı saptanmasının yanısıra 62 kültür negatif grubumuz içinde 35 (%56.5)'i HUT, histopatoloji ve kültür negatif olarak *H. pylori* enfeksiyonu olumsuz saptanmıştır.

CagA pozitif suşlara sahip olan hastaların 22'si kadın, 8'i erkek, yaş aralığı 23-67 ve yaş ortalaması ise 47.2 bulundu. *CagA* negatif suşlara sahip hastaların 23'ü kadın, 9'u erkek, yaş aralığı 22-65 ve yaş ortalaması ise 44.1 bulundu.

Histopatolojik olarak *cagA* negatif hastaların; 18 (%36.0)'i gastrit, 4 (%8.0)'ü atrofi, 7 (%14.0)'si intestinal metaplazi (IM) ve 21 (%42.0)'i enflamasyon olarak belirlenmiştir; *cagA* pozitif hastalardan; 17 (%32.7)'si gastrit, 4 (%7.7)'ü atrofi, 10 (%19.2)'u IM ve 21 (%40.4)'i enflamasyon olarak; kültür negatif histopatoloji ve/veya HUT pozitif veya negatif hastalarda; 14 (%31.1)'ü gastrit, 8 (%17.8)'i atrofi, 6 (%13.3)'sı IM, 15 (%33.3)'i enflamasyon ve 2 (%4.4) normal; enfekte olmayan hastalarda (Kültür negatif, HUT ve histopatoloji negatif); 6 (%13.6)'sı gastrit, 6 (%13.6)'sı atrofi, 5 (%11.4)'i IM, 18 (%40.9)'i enflamasyon ve 9 (%20.5)'u normal olarak belirlenmiştir (Tablo 8).

30 *cagA* pozitif hastada, antrum biyopsi örneğinde pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (Mann Whitney U testi, p=0.000); korpus biyopsi örneklerinde atrofi (Mann Whitney U testi, p=0.034) ve pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) (Mann Whitney U testi, p=0.003) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. *cagA* pozitif sonuçlar ile antrum ve korpus pitlerde enflamasyon (aktif enflamasyon) ve korpus atrofi arasında ilişki saptandı. *cagA* pozitifliği ile IM ve lamina propriada enflamasyon arasında ilişki saptanmadı.

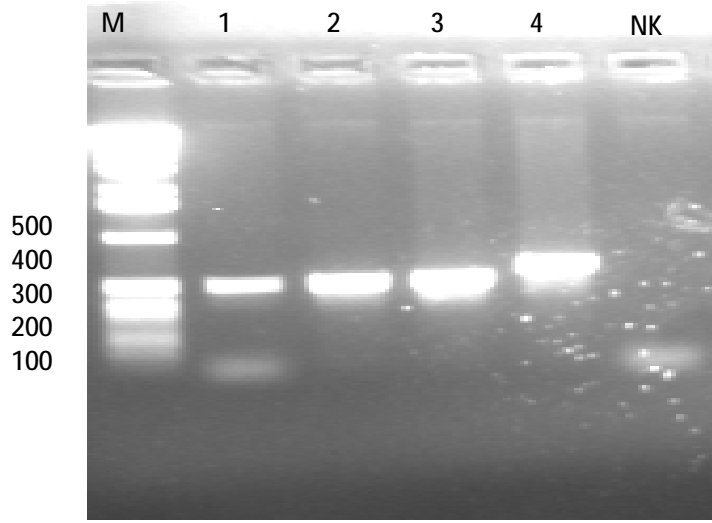
Hastaların *cagA* pozitifliği ile antrum aktif kronik gastrit arasında anlamlı bir fark saptandı (χ^2 testi, p=0.019), ancak hastaların *cagA* pozitifliği ile korpus histopatolojik tanısı arasında anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 testi, p=0.358).

Seksen dokuz *H. pylori* enfeksiyonu pozitif hastada FISH yöntemi ile çalışılan 60 hastanın klaritromisin prevalansı %31.7 olarak saptandı. Hastaların *cagA* pozitifliği ile antrum ve korpus klaritromisin duyarlı ve dirençli suşlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (χ^2 testi, antrum için p=0.372; korpus için p=0.931).

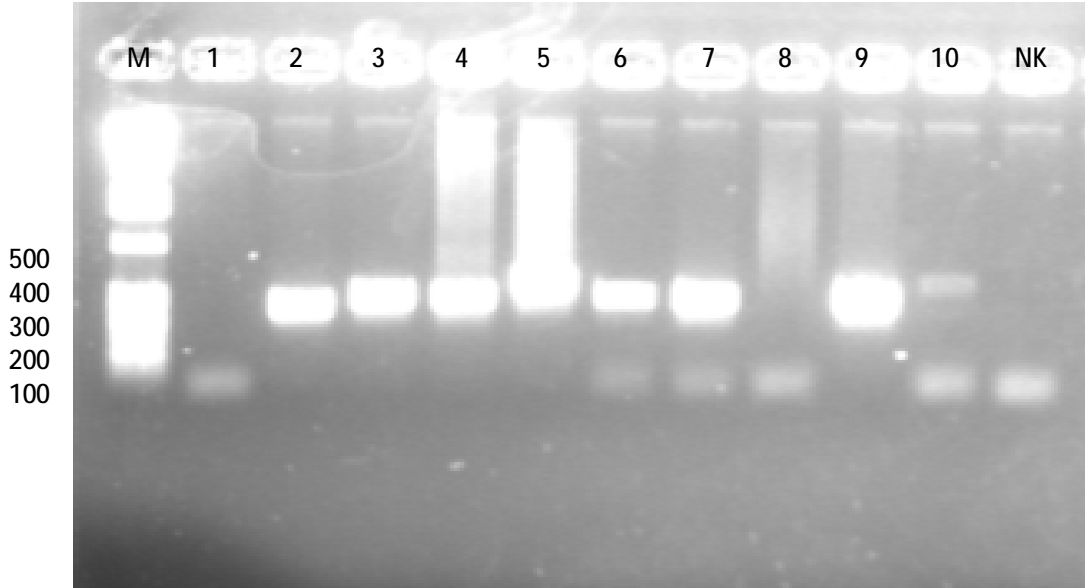
Tablo 8. Dispeptik 124 hastanın karakteristik özellikleri; 62 kültür pozitif hastanın *cagA* pozitif ve negatif sonuçlarına ve 62 kültür negatif hastanın HUT ve/veya histopatoloji sonuçlarına göre değerlendirilmesi

	Kültür Pozitif (n=62) (%50)		Kültür Negatif (n=62) (%50)	
	<i>cagA</i> negatif (n=32) (%51.6)	<i>cagA</i> pozitif (n=30) (%48.4)	Kültür Negatif Histopatoloji ve/veya HUT pozitif (n=27) (%43.5)	Kültür negatif Histopatoloji ve HUT negatif (Enfekte olmayan) (n=35) (%56.5)
Cinsiyet	23 K (%71.9) 9 E (%28.1)	22 K (%73.3) 8 E (%26.7)	22 K (%81.5) 5 E (%18.5)	22 K (%62.9) 13 E (%37.1)
Histopatoloji sonuçları	Gastrit= 18 (%36.0) Atrofi = 4 (%8.0) IM=7 (%14.0) Enflamasyon=21(%42.0)	Gastrit= 17 (%32.7) Atrofi = 4 (%7.7) IM=10 (%19.2) Enflamasyon=21(%40.4)	Gastrit= 14 (%31.1) Atrofi = 8 (%17.8) IM=6 (%13.3) Enflamasyon=15(%33.3) Normal=2 (%4.4)	Gastrit= 6 (%13.6) Atrofi = 6 (%13.6) IM=5 (%11.4) Enflamasyon=18(%40.9) Normal=9 (%20.5)

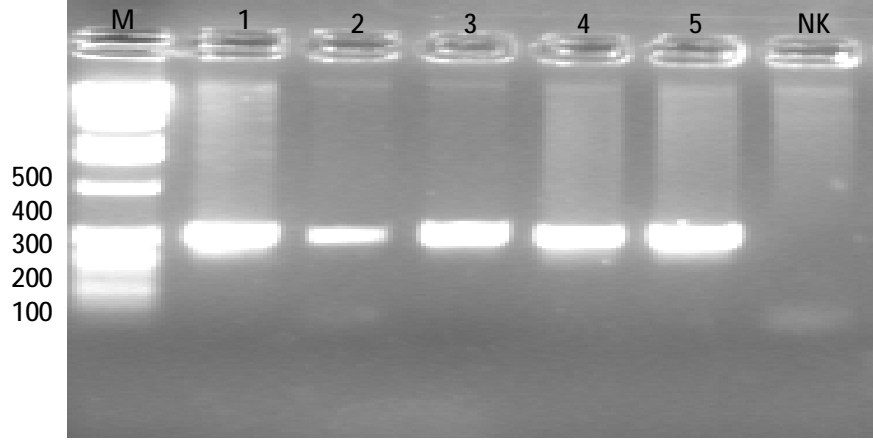
*IM, intestinal metaplazi



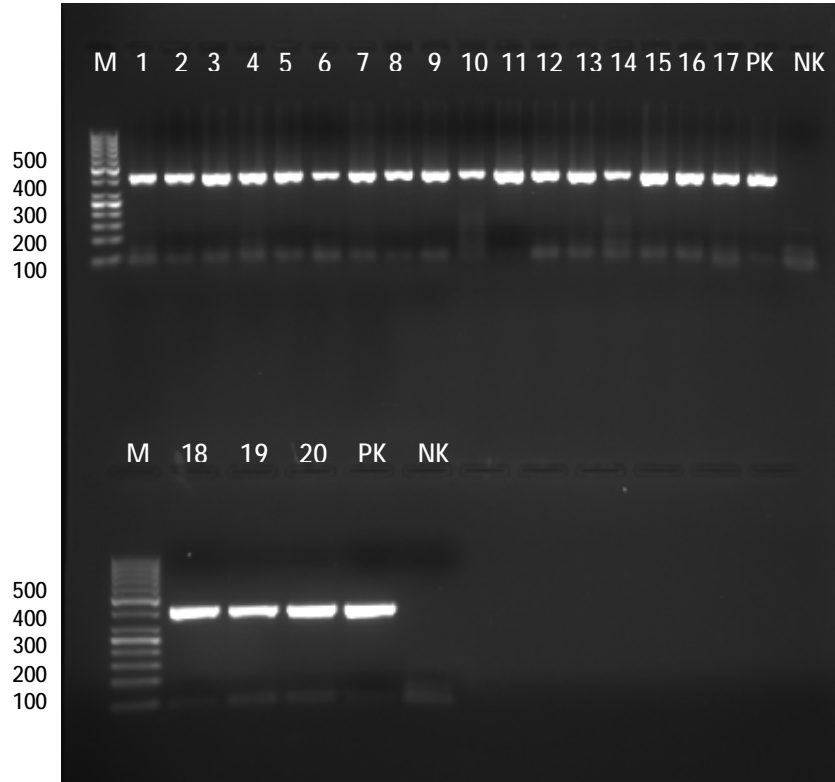
Resim 1. EPIYA PCR ürünlerinin elektroforez analiz sonuçları. *H. pylori* klinik suşlarından izole edilen DNA ürünlerinin (1-4 kuyucuk; Hasta no: 18A, 42A, 55A, 57A; A: Antrum) *cagA* PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder; NK: Negatif Kontrol.



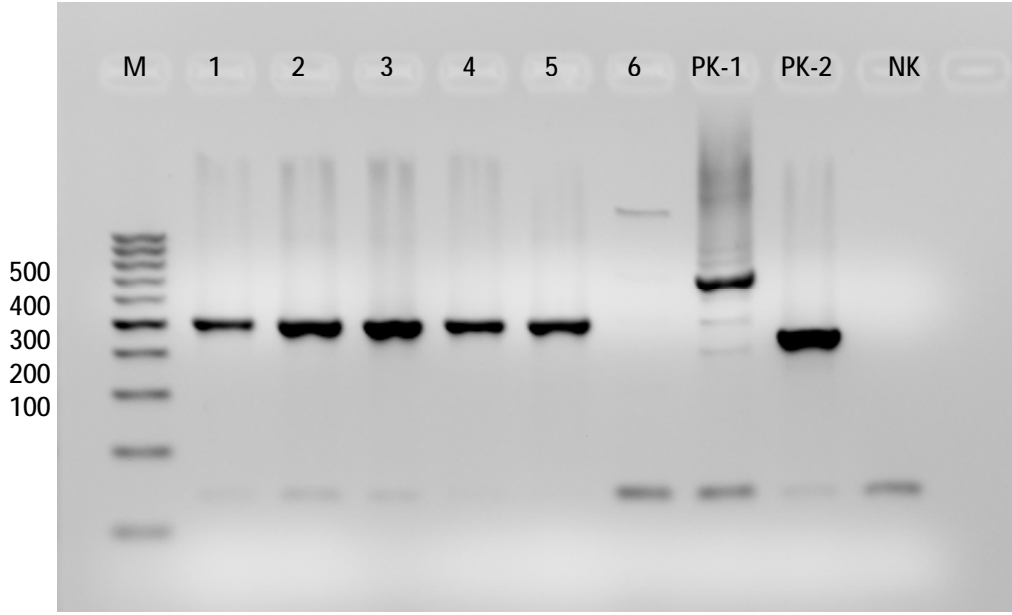
Resim 2. EPIYA PCR ürünlerinin elektroforez analiz sonuçları. *H. pylori* klinik suşlarından izole edilen DNA ürünlerinin (1-9 kuyucuk; Hasta No:15A, 19A, 20A, 12A, 41A, 47A, 51A, 65A, 44A; A: Antrum) *cagA* PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder; NK: Negatif Kontrol.



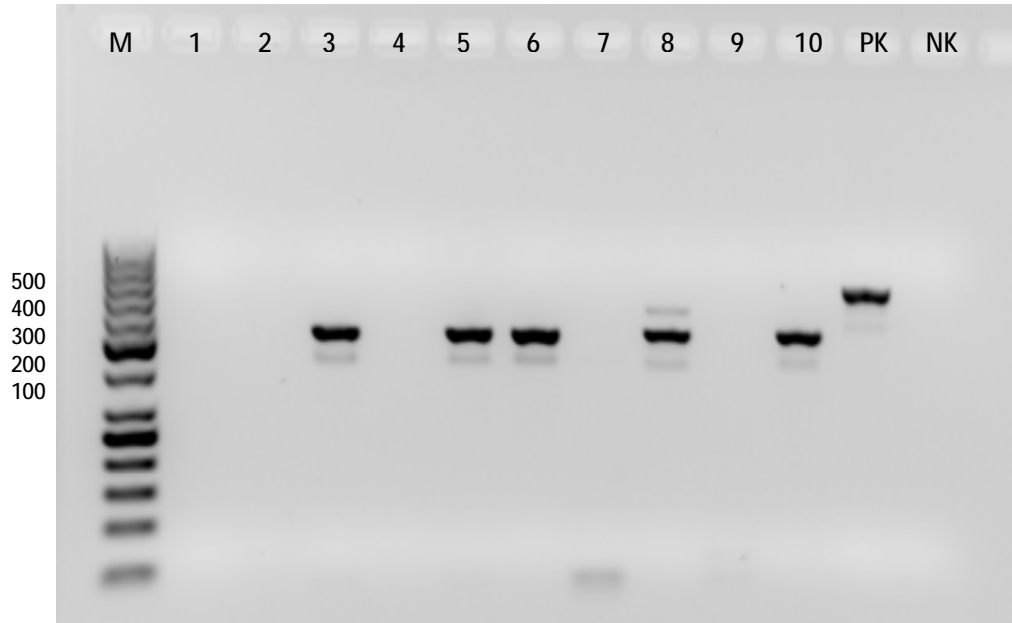
Resim 3. EPIYA PCR ürünlerinin elektroforez analiz sonuçları. *H. pylori* klinik suşlarından izoleedilen DNA ürünlerinin (1-5 kuyucuk; Hasta No:18K, 12K, 19K, 47K, 18A; A: Antrum, K: Korpus) *cagA* PCR ile amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder; NK: Negatif Kontrol.



Resim 4. *H. pylori* koloni HPU PCR %1'lik agaroz jel görüntüleri (beklenen ürün büyüklüğü 411 bp) M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1-20: Hasta örnekleri, PK: Pozitif kontrol (*H. pylori* NCTC 11637), NK:Negatif kontrol



Resim 5. *H. pylori* koloni *cagA* PCR %1.5'luk agaroz jel görüntüleri M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder 1-5: *cagA* pozitif hasta örnekleri, 6: *cagA* negatif hasta örnekleri PK1: pozitif kontrol NCTC 11637 PK2: pozitif kontrol J99, NK:Negatif kontrol



Resim 6. *H. pylori* koloni *cagA* PCR %1.5'luk agaroz jel görüntüleri M: Gene Ruler 50 bp DNA ladder; 3, 5, 6, 8, 10: *cagA* pozitif hasta örnekleri; 1, 2, 4, 7, 9: *cagA* negatif hasta örnekleri PK: pozitif kontrol NCTC 11637, NK:Negatif kontrol

Tablo 9. Kültür pozitif 62 dispeptik hastada CagA virulans faktörü (*cagA* pozitif ve *cagA* negatif) ile histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki

Kültür Pozitif (n=62)	Histopatolojik Tanı*		Histopatolojik Değerlendirme*										
	Hasta No	Antrum	Korpus	Antrum					Korpus				
				Atrofi	IM	Aktif Pilde Enflamasyon	Kronik Gastrit Lamina Propriada Enflamasyon	HPL	Atrofi	IM	Aktif Pilde Enflamasyon	Kronik Gastrit Lamina Propriada Enflamasyon	HPL
cagA pozitif (n=30)	3	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	3	3	0	0	1	3	3
	7	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	2	3	2	2	0	0	3	2	2
	9	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	1	0	3	2	2	0	0	0	2	2
	11	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	3	0	0	1	3	3
	12	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	3	1	0	0	2	1	3
	18	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	3	3	0	0	2	2	2
	19	şiddetli aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	3	2	0	0	1	0	1
	20	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	1	3	3	3	0	0	0	1	0
	21	aktif kronik gastrit	hafif düzeyde kronik superfisyal gastrit	1	1	1	0	3	1	3	1	0	3

41	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	1	2	1	0	0	2	2	3
42	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	1	0	2	2	2	0	0	0	1	1
44	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	1	3	3	3	3	1	3	3	3	3
47	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit, atrofik değişiklikler	0	1	1	2	2	2	0	2	3	1
52	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	1	2	2	3	0	0	1	1	1
55	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	2	2	1	0	0	1	2	1
57	aktif kronik gastrit ve fokal hafif atrofik gastrit	kronik gastrit	1	0	1	3	2	0	0	0	2	2
65	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	0	0	3	0	2	0	0	3	0	2
78	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	0	0	2	2	3
85	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	1	1	3	3	3	0	0	2	2	3
88	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	3	0	0	2	2	3
101	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	2	3	1	0	1	2	2
103	kronik aktif gastrit	kronik gastrit	0	0	1	2	2	0	0	0	2	0
106	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	3	1	0	0	1	2	2
107	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	2	2	3	3	0	0	2	2	3
109	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	0	0	1	2	3
127	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	2	3	1	0	0	2	3	3
129	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	1	2	2	0	0	1	2	3

Eİ5	X**	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Eİ	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	3	0	0	2	2	3	0	0	2	2	2
ŞG	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	2	2	2	0	0	2	2	0	0	0	1	0
5	Kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	2	2	3	0	1	0	3	0	1	0	2	3
8	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	2	2	3	0	0	0	3	0	0	0	2	0
13	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	1	0	1	2	1	0	1	1	2	2
15	kronik gastrit	kronik gastrit	1	2	1	3	3	3	0	0	3	3	0	0	2	2	3
24	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	3	3	2	0	0	3	2	0	0	1	2	2
29	aktif kronik gastrit	minimal kronik gastrit	0	0	0	1	1	2	0	0	1	2	0	0	0	1	1
30	aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	3	3
31	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	2	2	2	0	0	2	2	0	0	2	2	2
32	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	3	3	2	0	1	3	2	0	0	1	2	2
35	aktif kronik ve CLO mide	aktif kronik gastrit	0	1	1	2	2	2	0	0	2	2	0	0	1	2	2
39	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	2	1	1	3	0	2	1	3	0	0	2	3	3
43	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	2	2	2	0	1	2	2	0	0	0	1	1
51	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1
53	reaktif faveolar değişiklikler	orta şiddette atrofi kronik gastrit	0	0	0	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0
54	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	1	1	2	0	1	1	2	0	0	1	2	2
63	kronik aktif gastrit	kronik gastrit	0	0	1	2	2	1	0	1	2	1	0	0	1	1	1

caga Negatif (n=32)

64	aktif kronik gastrit	X	0	0	2	2	3	X	X	X	X
66	Aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	1	2	2	0	0	0	1
67	aktif kronik gastrit	minimal kronik enflamasyon	0	0	2	2	2	0	0	0	3
68	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	1	0	0	1	1
80	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	2	3	0	0	0	1
93	aktif kronik gastrit	hafif enflamasyon	0	1	2	2	3	0	0	0	0
95	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	0	3	2	0	0	0	2
113	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	2	3	3	0	1	2	2
124	hafif şiddette atrofi aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	1	0	1	3	2	0	0	1	2
128	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	1	2	0	0	2	2
130	kronik gastrit	hafif derecede kronik gastrit	0	0	0	2	2	0	0	0	2
131	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	2	0	0	0	1	2
132	aktif kronik gastrit	aktif kronik atrofik gastrit	0	0	1	2	2	0	0	1	2
E2	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	2	2	0	0	0	2
E13	X	aktif kronik gastrit	X	X	X	X	X	0	0	1	2
ŞA	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	0	2	2	0	0	1	3

*Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilmiştir. Yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3); ** E13, E15 ve 64 kültür yapılmış ancak antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri histopatolojik incelemeeye gönderilmemiştir (X).

Tablo 10. Kültür pozitif 62 dispeptik hastada CagA virulans faktörü (cagA pozitif ve cagA negatif) sonuçlarının histopatolojik tanı ve klaritromisin duyarlılığı ile değerlendirilmesi

Kültür Pozitif Hasta No (n=62)	Cinsiyet	Histopatolojik Tanı*		Klaritromisin duyarlılığı	
		Antrum	Korpus	Antrum	Korpus
3	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
7	E	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
9	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
11	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
12	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
18	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Dirençli	Duyarlı/dirençli
19	K	şiddetli aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı/Dirençli	Duyarlı
20	E	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
21	E	aktif kronik gastrit	hafif düzeyde kronik superfisiyal gastrit	Duyarlı	Duyarlı/dirençli
41	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
42	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
44	K	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	Y**	Y
47	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit, atrofik değişiklikler	Duyarlı	Duyarlı
52	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı

cagA pozitif (n=30)

55	K	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
57	K	aktif kronik gastrit ve fokal hafif atrofik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı/dirençli
65	K	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
78	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
85	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
88	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
101	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
103	K	kronik aktif gastrit	kronik aktif gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	- ***
106	K	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Dirençli	Duyarlı
107	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
109	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
127	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
129	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
E15	K	X****	X****	X	X	X
Eİ	K	kronik gastrit	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Dirençli
ŞG	K	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y

		çaga Negatif (n=32)				
5	K	Kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
8	E	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
13	K	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Dirençli
15	E	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
24	K	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
29	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	minimal kronik gastrit	Duyarlı/Dirençli	Duyarlı
30	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	-	Dokuda problem
31	K	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı/Dirençli	Dirençli
32	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı/dirençli	Duyarlı
35	K	aktif kronik ve CLO mide	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
39	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
43	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	-
51	K	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı/Dirençli	Duyarlı/dirençli
53	K	reaktif faveolar değişiklikler	reaktif faveolar değişiklikler	orta şiddette atrofi kronik gastrit	-	-
54	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Dokuda problem
63	E	kronik aktif gastrit	kronik aktif gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
64	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	X	Y	X
66	E	Aktif kronik gastrit	Aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
67	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	minimal kronik enflamasyon	Duyarlı	Duyarlı
68	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
80	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı

93	K	aktif kronik gastrit	hafif enflamasyon	Duyarlı	Duyarlı
95	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	-	-
113	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	-
124	K	hafif şiddette atrofi aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
128	K	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	-	Dirençli
130	K	kronik gastrit	hafif derecede kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
131	K	kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
132	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik atrofik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
E2	E	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
E13	K	X	aktif kronik gastrit	Duyarlı/dirençli	Duyarlı
ŞA	K	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı

*Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilmiştir.; ** Y; yapılamadı.; *** (-) Parafine gömülü formalin fikse biyopsi kesitinde FISH sonucu antrum ve/veya korpus *H. pylori* varlığı gözlemlenmedi.; **** E13, E15 ve 64 kültür yapılmış ancak antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri histopatolojik incelemeye gönderilmemiştir (X).

Tablo 11. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde CagA pozitif ve negatif suşlarda EPIYA motif tipi, histopatolojik tanı ve değerlendirme ile klaritromisin duyarlılığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

		CagA Pozitif		CagA Negatif	
		Antrum	Korpus	Antrum	Korpus
EPIYA Motif Tipi	ABC	18	16	0	0
	ABCC	6	7	0	0
Histopatolojik Tanı	Aktif Kronik Gastrit	24	31	18	14
	Kronik Gastrit	4	29	13	17
Histopatolojik Değerlendirme	Atrofi	6	3	0	0
	İntestinal Metaplazi	10	2	6	3
Klaritromisin Duyarlılığı	Duyarlı	21*	19**	18****	20*****
	Dirençli	6	7	10	9

* 3 tane, ** 4 tane, *** 1 tane, **** 3 tane, klaritromisin duyarlılığı çalışılmadı.

6.6. *Helicobacter pylori* CagA-Pozitif EPIYA Motif Sekans Sonuçları

Çalışmaya alınan 124 hastadan kültür pozitif 62 hastanın 30 (%48.4)'u *cagA* pozitif saptanmıştır. Bu hastalardan 21 (%70.0)'ünün EPIYA motif sayısı üç (ABC), yedi (%23.3) hastanın EPIYA motif sayısı üçten fazla (ABCC) ve iki (%6.7) hasta suşunda ise hem ABC hem de ABCC olmak üzere iki tip EPIYA motif sayısı bulundu. *H. pylori* NCTC 11637

standart suşunun EPIYA motifi EPIYA-ABCCC ve J99 standart suşunun EPIYA motifi EPIYA-BC olarak saptandı (Şekil 18).

Histopatolojik olarak EPIYA motif sayısı üç (EPIYA ABC) olan hastaların; 11 (%29.7)'i gastrit, 4 (%10.8)'ü atrofi, 6 (%16.2)'sı IM ve 16 (%43.2)'sında enflamasyon saptanmıştır. EPIYA motif sayısı üçten fazla (ABCC) olan hastaların; 3 (% 30)'ü gastrit, 1 (% 10)'i atrofi, 2 (%20)'si IM ve 4 (% 40)'ünde enflamasyon saptanmıştır. Ayrıca hem üç (EPIYA ABC) hemde üçten fazla (EPIYA ABCC) EPIYA motif içeren iki hastada; 1 (%33.3) gastrit, 1 (%33.3) IM ve 1 (%33.3) enflamasyon saptanmıştır (Tablo 3).

Mann Whitney U testine göre, histopatolojik bulgular ile EPIYA motif tipleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı. *cagA* pozitifliği ile histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanarak ilişki bulunurken, EPIYA motif tipleri ile herhangi bir ilişki saptanmadı.

EPIYA sekans sonuçları aminoasit sırasındaki farklılıklara göre değerlendirildi. EPIYA A için “KVNKK”, EPIYA B için “QVAKK”, EPIYA C için “TIDDL” ve EPIYA D için “TIDFE” göre sınıflandırıldı.

Klaritromisin direnci açısından; EPIYA motif sayısı üç olan 4 hastada klaritromisin direnci ve EPIYA motif sayısı üçten fazla olan 3 hastada klaritromisin direnci saptandı.

Tablo 12. *cagA* pozitif 30 *H. pylori* suşunun EPIYA Motif Sonuçları

EPIYA Motif Sayısı	n= 30	%
EPIYA ABC	21	70
EPIYA ABCC	7	23.3
*EPIYA ABC ve EPIYA ABCC	2	6.7

* 7 ve 11 numaralı hastalarda hem 3 ve >3 EPIYA motif sayısı bulunmuştur.

Tablo 13. CagA virulans faktörü pozitif 30 *H. pylori* suşunun EPIYA motif sonuçları ile histopatolojik tanı ve değerlendirme arasındaki ilişki

CagA Pozitif (n=30)	Histopatolojik Tanı*		Histopatolojik Değerlendirme*										
	Hasta No	Antrum	Korpus	Antrum					Korpus				
				Atrofi	IM	Aktif Pillerde Enflamasyon	Kronik Gastrit Lamina Propriada Enflamasyon	HPL	Atrofi	IM	Aktif Pillerde Enflamasyon	Kronik Gastrit Lamina Propriada Enflamasyon	HPL
EPIYA ABC (n=21)	12	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	3	1	0	0	2	1	3
	18	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	3	3	0	0	2	2	2
	19	şiddetli aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	3	3	2	0	0	1	0	1
	21	aktif kronik gastrit	hafif düzeyde kronik superfisiyal gastrit	1	1	1	0	3	1	3	1	0	3
	42	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	1	0	2	2	2	0	0	0	1	1
	44	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	1	3	3	3	3	1	3	3	3	3
	47	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit, atrofik değişiklikler	0	1	1	2	2	2	0	2	3	1
	52	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	1	2	2	3	0	0	1	1	1

55	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	2	2	2	1	0	0	1	2	1
85	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	1	1	3	3	3	3	0	0	2	2	3
88	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	3	0	0	2	2	3
101	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	2	2	3	1	0	1	2	2
103	kronik aktif gastrit	kronik gastrit	0	0	1	2	2	2	0	0	0	2	0
106	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	2	3	3	1	0	0	1	2	2
107	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	2	2	3	3	3	0	0	2	2	3
109	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	2	0	0	1	2	3
127	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	2	3	3	1	0	0	2	3	3
129	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	1	2	2	2	0	0	1	2	3
E15	X**	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ei	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	3	0	0	2	2	2
ŞG	kronik gastrit	kronik gastrit	0	0	0	2	2	2	0	0	0	1	0

EPIYA ABCC (n=7)	3	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	3	3	0	0	1	3	3
	9	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	1	0	3	2	2	0	0	0	2	2
	20	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	1	3	3	3	0	0	0	1	0
	41	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	1	1	2	1	0	0	2	2	3
	57	aktif kronik gastrit ve fokal hafif atrofik gastrit	kronik gastrit	1	0	1	3	2	0	0	0	2	2
	65	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	0	0	3	0	2	0	0	3	0	2
	78	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	2	0	0	2	2	3
	7	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	0	2	3	2	2	0	0	3	2	2
	11	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	0	0	1	2	3	0	0	1	3	3

*Güncellenmiş Sydney Sisteminde göre değerlendirilmiştir: Yok (grade 0), hafif (grade 1), orta (grade 2) ve şiddetli (grade 3); **E15 kültür yapılmış ancak antrum ve/veya korpus biyopsi örnekleri histopatolojik incelemeye gönderilmemiştir (X).

A

EPIYA A

	*	20	*	40	*	60	*	80						
T11A :	GRNGI	SRFAATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	G	RFYAKVKKK	AGQA : 57					
T9C :	-----	C-NGL	SCFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	CLKNS	---C	RFYAKVKKK	AGQA : 56				
T65A :	---	VNGTLVG	NGLKNS	SELEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	GLKNGKIKGPF	RFYAKVKKK	AGQA : 69			
T3A :		GLTVG	NGI	SRFAATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	G	RFYAKVKKK	AGQA : 60			
T3C :	---	TLVR	WKL	SCFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	CLKNS	---C	RFYAKVKKK	AGQA : 59			
T18A :		VNGTLVG	NGI	SRFAATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	G	RFYAKVKKK	AGQA : 62			
T18C :	---	C-NGL	SCFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	CLKNS	---C	RFYAKVKKK	AGQA : 56				
T11C :	---	GLTVG	NGI	SCFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---T	RFYAKVKKK	AGQA : 61			
T41A :		R	WGI	SRFAATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 57			
T9A :	---	C-NGL	SCFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	CLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 57				
T42A :	---	G-NGL	SELEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 55				
T52A :		NG	ISGTFATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 54				
T52C :	---	MEFSG	C-NC	LSGFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 59			
T57A :		NGTLVG	NGI	SRFAATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 61			
T57C :	---	MEFSG	C-NC	LSGFEATA	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 60			
T20A :	---	SSV	NGL	SGAEVIT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 57			
T20c :		NPS	RII	SGAEVIT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 57			
T55A :	---	C-NC	LSGFEAT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 55				
T7A :		G	NG	LSGAEAT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 55			
T47A :		MEFSG	NG	ISGAEAT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 59			
T21A :	---	SDC	NC	LSGFEAT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 57			
T9A :		CDGTLVG	NGI	ISGAEVIT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 62			
T44A :	VENC	VNGTLVG	NC	LSGAEAT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 66			
T12C :	---	FSM	ATLS	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 50				
T19C :		FSVMI	YKAL	ATLS	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS		RFYAKVKKK	AGQA : 60			
7C :	---	CEWCEW	DSRI	ISRSSENS	FKL	FCHRKS	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 50			
T47C :	MEFSVMI	YMR	LSGAEAT	AKNFSDIKKELN	RF	RNFNNNNN	GLKNS	---	RFYAKVKKK	AGQA : 60				
			s	eat	l	knf	sdikkeln	R		rnfnnnnn	glkn		RFYAKVKKK	gq

EPIYA B

	*	100	*	120	*	140	*	160		
T11A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 101
T9C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T65A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 113
T3A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T3C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 102
T18A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 105
T18C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 99
T11C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 104
T41A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T9A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T42A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 98
T52A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 98
T52C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T57A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 105
T57C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 104
T20A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 101
T20c :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 101
T55A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 99
T7A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	FFLKKHCKVDLLSKVCRSVSDEDIYATIDDLQ	FPL	RHD	: 133
T47A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T21A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 101
T9A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 98
T44A :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	YPL	RHD	: 110
T12C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	YPL	RHD	: 94
T19C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 104
7C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 100
T47C :	ASPEE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG	-----	FPL	RHD	: 103
	aspeE	IYQ	QVAKKVNAR	IDL	LNQ	IASGLGCVGQAG		fpl	RHD	

EPIYA_C

EPIYA_C

	A	180	A	200	A	220	A	240	
T11A	: KVE	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 143
T9C	: KVK	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEPKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	GFPELKRHDKVDLSKV	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 176
T65A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEPKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	GFPELKRHDKVDLSKV	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 189
TJA	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKV	-----	CGPEFLKRHDKVDLSKV	: 179
TJC	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEFLKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	GGPEFLKRHDKVDLSKV	-----	GGPEFLKRHDKVDLSKV	: 178
T18A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEFLKRHDQGL	-----	-----	VDLSKV	: 148
T18C	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEPKRHDKY	-----	-----	VDLSKV	: 141
T11C	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKV	-----	CGPEFLKRHDKVDLSKV	: 180
T41A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKV	-----	CGPEFLKRHDKVDLSKV	: 176
T9A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEFLKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	GGPEFLKRHDKVDLSKV	-----	GGPEFLKRHDKVDLSKV	: 176
T42A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	GGPEPKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	-----	-----	VDLSKV	: 140
T52A	: KVC	-DLSKVGLS	--ASE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 140
T52C	: KVC	-DLSKVGLS	--ASE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 145
T57A	: KVK	-DLSKVGLS	--ASE	-EPIYATIDDLG	GGPEFLKHKHAKVDELISKVGLSASPEIYATIDDLG	GGPEFLKHKHAKVDELISKV	-----	GGPEFLKHKHAKVDELISKV	: 161
T57C	: KVK	-DLSKVGLS	--ASE	-EPIYATIDDLG	GGPEPKRHDKVDLSKVGRSVSEKPEIYATIDDLG	GGPEPKRHDKVDLSKV	-----	GGPEPKRHDKVDLSKV	: 180
T20A	: KVD	-DLSKVGLS	--ASE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 143
T20C	: KVD	-DLSKVGLS	--ASE	-EPIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKVGLSASPEIYATIDDLG	CGPEFLKRHDKVDLSKV	-----	CGPEFLKRHDKVDLSKV	: 177
T55A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 141
T7A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 175
T47A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 145
T21A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 143
19A	: -----	-----	-----	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 128
T44A	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 152
T12C	: KAG	-VFLKIRL	--ASE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 135
T19C	: KVD	-DLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 146
7C	: KVESQVKKVGRICQVSE	-----	-----	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 179
T47C	: KSG	-VLSKVGRS	--VSE	-EPIYATIDDLG	-----	-----	-----	GFPELKRHDKVDLSKV	: 142
		kv	dlskvgr s	sp	EPIYatidDLG			qpflk h kvdlskv	

	A	260	
T11A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 166
T9C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 190
T65A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 212
TJA	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 196
TJC	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 207
T18A	: GI	-KIDNINQAVSIAK	: 155
T18C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 156
T11C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 197
T41A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 196
T9A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 200
T42A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 163
T52A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 150
T52C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 164
T57A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 200
T57C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 200
T20A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 161
T20C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 199
T55A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 160
T7A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 199
T47A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 163
T21A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 166
19A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 151
T44A	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 171
T12C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 150
T19C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 161
7C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 180
T47C	: GISSNCKIAG	-KIDNINQAVSIAK	: 147

gissnck i a g

B

						<u>EPIYA A</u>	<u>EPIYA B</u>		
		7	23	4	40	4	60	4	80
15 2	:	VKNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	79		
106-2	:	LRNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	79		
127	:	VKNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	78		
85 2	:	VNCPVNGTLVGNGLSKAKATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	74		
88 1	:	LRNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	79		
103-2	:	VKNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	78		
88-2	:	VKNCVNGTLVGNGLSKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	77		
80	:	VNCPVNGTLVGNGLSKAKATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	74		
NC	:	NCPVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	73		
107-1	:	-KNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	77		
85-1	:	-----LISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	65		
78 2	:	-----LISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	57		
E1	:	VKLVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	78		
129-1	:	-KNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	77		
129-2	:	VKTCVNGTLVGNGLSKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	78		
101 2	:	VKNCVNGTLVGNGLSKAKATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	78		
101 1	:	VKNCVNGTLVGNGLSCAEATLISKNFSDIKKELNPKL	EMFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	78		
JM	:	MEISVNC YLQKIDGLSKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	85		
J	:	-----VNCPVNGTLVGNGLSKAKATLISKNFSDIKKELNPKL	ENFRNNNM	GLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPE	EPIYAGQVAK	:	57		

ng qnqla cat LSKNFSDIKKELNPKL qNFRNNNMGLKRSCEPIYAKVNNKNTAGQWASPEEPIYAGQVAK

EPIYA C

EPIYA C

		4	100	4	120	4	140	4	160
15 2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							102
106 2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							102
127	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							101
85-2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							97
88 1	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							102
103 2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							101
88-2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							100
80	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							90
NC	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA	GFPLKRHDKVDDLSKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDLSKVGRSVSPEPI						154
107 1	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							100
85-1	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							117
78-2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA	GFPLKRHDKVDDLSKVGRSVSPEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDLSKVGRSVSPEPI						122
E1	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							100
129 1	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							99
129-2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							100
101-2	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							101
101 1	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							101
JM	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							78
J	:	KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA							111

KVNAKIDGLNGLASGLDGVGQAA

EPIYA C

	180	200	220	240					
15 2 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 170
106-2 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS-- : 171
127 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS- : 171
85 2 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 166
88 1 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 172
103 2 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 172
88-2 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 171
SG :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS-- : 166
NC :	YATIDDLGGPF	ELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 202
107 1 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 170
85-1 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS- : 158
76-2 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 194
E1 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 168
129 1 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 169
129-2 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS- : 170
101-2 :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 173
101 1 :	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS	: 165
JM :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 128
J :	-----	CFELKRRH	KVVDLSKVG	RSWEPEPIYA	TIDDLGGPF	FLKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	EAQKIDNL	SGAVS : 151

EPIYA C

	260	280	300	
15-2 :	-----	-----	-----	: -
106 2 :	-----	-----	-----	: -
127 :	-----	-----	-----	: -
85-2 :	-----	-----	-----	: -
88 1 :	-----	-----	-----	: -
103 2 :	AK	-----	-----	: 174
88-2 :	AK	-----	-----	: 173
SG :	-----	-----	-----	: -
NC :	-----	-----	-----	: -
107 1 :	AK	-----	-----	: 172
85-1 :	-----	EA	-----	: 161
76-2 :	LAGVGGAG	PFELKRHDKVDL	SKVGLSRNQ	: 253
E1 :	-----	-----	-----	: -
129-1 :	-----	EA	-----	: 171
129-2 :	-----	EA	-----	: 173
101 2 :	LK	-----	-----	: 175
101 1 :	YSG	-----	-----	: 168
JM :	-----	-----	-----	: -
J :	AK	-----	-----	: 153

Şekil 18. *H. pylori* CagA pozitif suşların sekans analiz sonuçlarının suşlar arasındaki aminoasit sırasındaki farklılıklara EPIYA tiplerinin karşılaştırılması. EPIYA sekans sonuçları aminoasit sırasındaki farklılıklara göre değerlendirildi. EPIYA A için “KVNKK”, EPIYA B için “QVAKK”, EPIYA C için “TIDDL” olarak analiz edildi. (NC: *H. pylori* NCTC 11637 CagA ürünü; J ve JM: *H. pylori* J99 CagA ürünü; diğerleri dispeptik hasta suşları; A- A: antrum, C: korpus B- 1: antrum 2: korpus)

Tablo 14. *cagA* pozitif 30 *H. pylori* suşlarının EPIYA motif sonuçlarının karakteristik özellikleri

EPIYA Motifleri	EPIYA ABC (n=21)	EPIYA ABCC (n=7)	EPIYA ABC ve EPIYA ABCC (n=2)
Cinsiyet	15 K (%71.4) 6 E (%28.6)	6 K (%85.7) 1 E (%14.3)	1 K (%50) 1 E (%50)
Ortalama Yaş	15 K (47.1) 6 E (49.7)	6 K (48.5) 1 E (24)	1 K (40) 1 E (55)
Histopatoloji Sonuçları	Gastrit= 11 (%29.7) Atrofi = 4 (%10.8) IM=6 (%16.2) Enflamasyon=16 (%43.2)	Gastrit= 3 (%30) Atrofi = 1 (%10) IM=2 (%20) Enflamasyon=4 (%40)	Gastrit= 1 (%33.3) IM=1 (%33.3) Enflamasyon=1 (%33.3)

*IM, intestinal metaplazi

Tablo 15. İzole edilen *H. pylori* suşlarında saptanan 30 *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının EPIYA motif sonuçlarının histopatolojik tanı ve klaritromisin duyarlılığı ile değerlendirilmesi

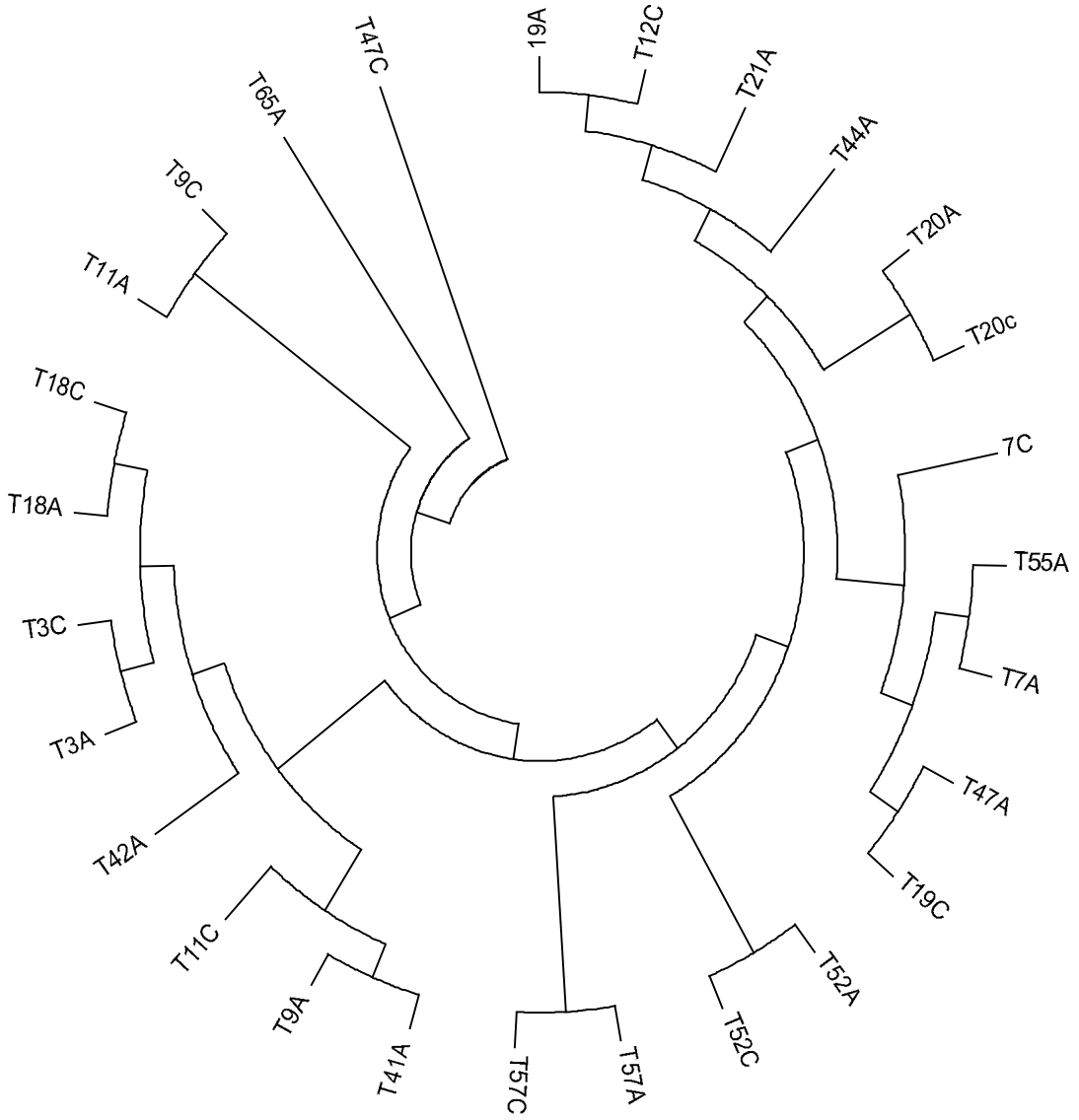
CagA Pozitif (n=30)	Hasta No	Cinsiyet	Histopatolojik Tanı*		Klaritromisin Duyarlılığı	
			Antrum	Korpus	Antrum	Korpus
EPIYA ABC (n=21)	12	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	18	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Dirençli	Duyarlı/dirençli
	19	K	şiddetli aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı/Dirençli	Duyarlı
	21	E	aktif kronik gastrit	hafif düzeyde kronik superfisiyal gastrit	Duyarlı	Duyarlı/dirençli
	42	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	44	K	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	Y**	Y
	47	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit, atrofik değişiklikler	Duyarlı	Duyarlı
	52	K	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	55	K	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	85	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	88	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	101	E	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
	103	K	kronik aktif gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	- ***
	106	K	kronik gastrit	kronik gastrit	Dirençli	Duyarlı
107	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı	

109	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
127	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
129	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
E15****	K	X	X	X	X	X
Eİ	K	kronik gastrit	kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Dirençli
ŞG	K	kronik gastrit	kronik gastrit	kronik gastrit	Y	Y
3	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
9	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
20	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
41	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli
57	K	aktif kronik gastrit ve fokal hafif atrofik gastrit	aktif kronik gastrit ve fokal hafif atrofik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı/dirençli
65	K	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	şiddetli aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
78	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
7	E	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	kronik gastrit	Duyarlı	Duyarlı
11	K	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	aktif kronik gastrit	Dirençli	Dirençli

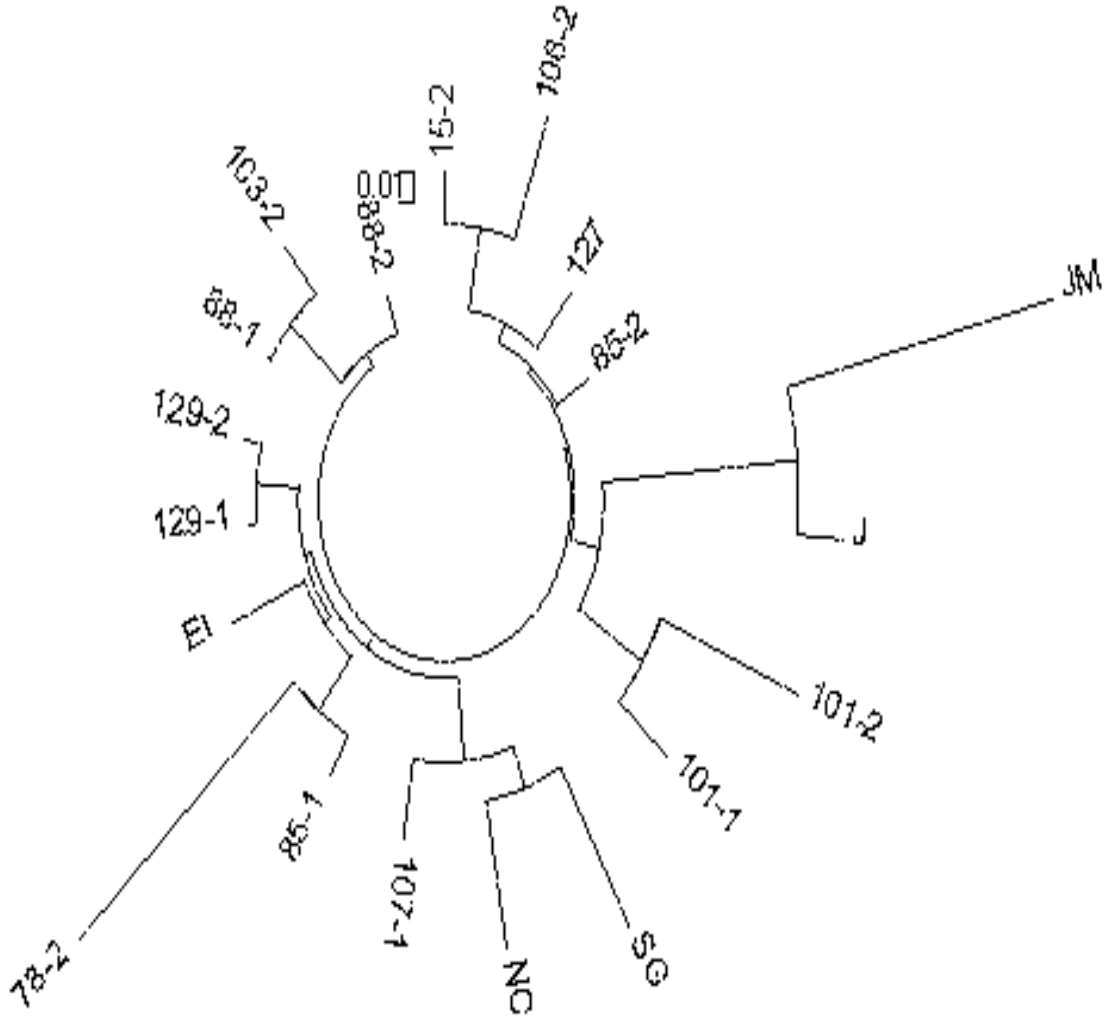
* Güncellenmiş Sydney Sistemine göre değerlendirilmiştir. ; ** Y; yapılamadı; *** (-) Parafine gömülü formalin fikse biyopsi kesitinde FISH sonucu antrum ve/veya korpus *H. pylori* varlığı gözlemlenmedi. **** E15 kültür yapılmış ancak antrum ve korpus biyopsi örnekleri histopatolojik incelemeye gönderilmemiştir (X).

6.7. *Helicobacter pylori* CagA Filogenetik Ağaç Sonuçları

Sekansa gönderilen kültür pozitif hastalarımızın antrum ve korpustan izole edilen 30 *H. pylori cagA* pozitif suşlarının aminoasit dizileri kullanılarak Mega 4.0.2 programı ile filogenetik ağaç çizildi. Bu sonuçlara göre altı hastamızın antrum ve korpusundan izole edilen *H. pylori* suşlarının filogenetik olarak uzak oldukları bulundu (Şekil 19,20). *H. pylori* CagA pozitif hasta suşları, *H. pylori* NCTC 11637 ve *H. pylori* J99 CagA ürünlerinin filogenetik analiz sonuçları Şekil 19 ve 20’de gösterilmiştir. Ayrıca J99 suşunun diğer tüm suşlardan uzak olduğu saptandı.



Şekil 19. *H. pylori* CagA Filogenetik Ağaç. Filogenetik analiz sonucu Mega 4.0.2 software'e göre değerlendirildi (www.megasoftware.com). 18, 3, 57, 52 ve 20 numaralı hastaların antrum ve korpus biyopsilerindeki suşlar (18A-18C, T3A-T3C, T57A-T57C, T52A-T52C, T20A-T20C) filogenetik olarak birbirleri ile yakın ilişkili; 11, 7, 47, 9 ve 19 numaralı hastalar antrum ve korpus biyopsilerindeki suşlar (T11A-T11C, T7A-T7C, T47A-T47C, T9A-T9C, T19A-T19C) filogenetik olarak birbirleri ile uzak ilişkilidir (A: antrum, C: korpus).



Şekil 20. *H. pylori* CagA Filogenetik Ağaç. Filogenetik analiz sonucu Mega 4.0.2 software'e göre değerlendirildi (www.megasoftware.com). 85, 88, 103, 129, Eİ, 101, 107, SG numaralı hastaların antrum ve/veya korpus biyopsilerindeki suşlar (85-2, 88-2, 103-2, 129-1, 129-2, Eİ, 101-1, 101-2, 107-1, SG) filogenetik olarak birbirleri ile yakın ilişkilidir; 85 numaralı hastanın antrum ve korpus biyopsilerindeki suşlar (85-1, 85-2) filogenetik olarak birbirleri ile uzak ilişkilidir. JM ve 78 numaralı hastanın korpus biyopsisindeki suşu (78-2) filogenetik olarak tüm suşlardan uzaktır. (NC: *H. pylori* NCTC 11637 CagA ürünü; J ve JM: *H. pylori* J 99 CagA ürünü; diğerleri: hasta suşları CagA ürünleri; 1: antrum, 2: korpus)

7. TARTIŞMA

Helicobacter pylori (*H. pylori*) Gram negatif, flajellalı, spiral yapıda mikroaerofilik bir bakteridir (1,2). *H. pylori* gastrit, gastrik ve duodenal ülserler, gastrik karsinoma ve mukozailişkilil lenfoid doku (MALT) lenfoma da major patojen olarak bildirilmektedir (5,9). *H. pylori*, IACR tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (9,10,14). *H. pylori* enfeksiyonu ile oluşan gastroduodenal hastalıklar gözönüne alındığında bu bakterinin halk sağlığı açısından önemli bir rolü bulunmaktadır (2).

H. pylori üreaz, dış membran proteinleri gibi kolonizasyon ve tutunma aşamasında, ayrıca VacA ve CagA gibi çeşitli sinyal mekanizmalarını uyararak enfeksiyonun patogeneğinde rol oynayan virulans faktörlerine sahiptir (16). *H. pylori*'nin hastalık yapma yeteneği vakuol oluşturucu sitotoksin (VacA), kan grup antijeni bağlayan adezin (BabA), nötrofil-aktive edici protein (HP-NAP), dış inflamatuvar protein A (OipA), duodenal-ülser oluşumunu destekleyen gen (*dupA*) ve *cag* patojenite adası (*cag* PAI) gibi birçok virulans faktörünü eksprese etmesi ile ilişkilidir (22). *cagA* geninin kodladığı ~120-145 kDa'luk CagA proteini tip IV sekresyon sistemi (T4SS) ile gastrik epitel hücreye girer ve plazma membranına yerleşir (1,3,5,9,10). CagA'nın tirozin fosforilasyonu, 5 aminoasitten (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) oluşan EPIYA motif bölgesinde gerçekleşir (14,18,19,21,24-26.)

Birçok EPIYA motifi içeren *H. pylori* suşları gastrik kanser ve atrofik gastrit ile ilişkilil olarak; hücre iskeletinin yeniden düzenlemesine ve yüksek seviyede CagA fosforilasyonuna sebep olur (28). CagA'nın T4SS ile translokasyonu başlar ve aynı zamanda fokal aktivasyon kinaz (FAK) ve Src kinaz uyarılır (29). Konak hücredeki translokasyondan sonra CagA, Src ailesi kinazı tarafından fosforillenir ve "hummingbird fenotipi" olarak adlandırılan konak hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini uyarır. Ancak, "hummingbird fenotipi" fenomeni tanımı hala tartışmalıdır. Hücre uzaması ve hücre hareketinden sorumlu olan hummingbird fenomeninin tanımının tam olarak yapılması için hücre yanıtındaki moleküler mekanizmanın ve CagA sinyallerinin daha iyi anlaşılması gerektiği bildirilmiştir (20).

H. pylori genetik çeşitliliğe sahip bir mikroorganizmadır. Suşlar arasındaki bu genetik çeşitlilik farklı klinik sonuçların oluşmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (20). Bu nedenle farklı populasyonlardaki *cagA* geninin 3' bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesi önemli olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi

Gastroenteroloji Polikliniği'ne dispeptik yakınma ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan hasta grubumuzdan izole ettiğimiz *H. pylori* suşlarının *cagA* gen polimorfizmini ve çeşitliliğini, klaritromisin, histopatoloji bulguları ile ilişkisini araştırılmıştır

CagA'nın fosforilasyonu karboksi terminal bölgesinde bulunan ve farklı sayılarda tekrarlardan oluşabilen beş aminoasitten oluşan Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) Motifleri ile gerçekleşir (7,22,24-26,95,153). Batı suşlarının içerdiği CagA proteini EPIYA-A, EPIYA-B ve EPIYA-C segmentlerinden (EPIYA-ABC) oluşur. Doğu Asya *H. pylori* suşlarının içerdiği CagA proteini ise EPIYA-A ve EPIYA-B içerir ancak EPIYA-C içermez. EPIYA-C yerine, CagA proteini EPIYA-D içerir (7,24,153). Takata ve ark. ELISA yöntemi ile Doğu Asya CagA'ya spesifik EPIYA-D segmentine karşı oluşan anti-CagA-P adını verdikleri bir antikor geliştirdiklerini ve anti-CagA-P antikor titresi ile gastrik derecesi arasında bir ilişki bildirmişlerdir. Anti-CagA-P miktarı ile gastrik kanser ve ayrıca diğer gastrik hastalıklar arasındaki ilişkinin araştırılmasının gerektiğini önermişlerdir (139). Çalışmamızda hem antrum hem de korpus gastrik biyopsi örneğinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinin polimorfizm sınıflandırılması çalışılmış ve 124 hastanın 30'u *cagA* pozitif olarak saptanmıştır. Hem antrum hem de korpustan 27 tane *H. pylori* izolatu elde edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, dispeptik yakınmalı hasta grubunda *H. pylori cagA* pozitif suşların prevalansının (%48.4) düşük olduğu sonucuna varılmıştır. *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının gastrik kanser riskini arttırdığı (139) ve duodenal ülser ve gastrik mukozal atrofi ile ilişkisi bildirilmektedir (45).

Türkiye'de anti-CagA IgG antikor varlığı hasta grubunda %85.5 ve asemptomatik hasta grubunda ise %50 bildirilmiştir (154). Serin ve ark. serum *cagA* pozitifliği %97.2, peptik ülserli hastalarda %100 ve ülseri olmayan dispeptik hastalarda ise %95.6 serumda anti-*cagA* pozitiflik oranları bildirilmiştir (155). Yılmaz ve ark. 56 hastadan 48 (%85.7)'inin *H. pylori* IgG seropozitifliği %82.1, IgA seropozitifliği %48.2; Westernblot IgG seropozitifliğinin %80.4 ve IgA seropozitifliğinin ise %33.9 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, CagA IgG'nin %50, VacA IgG'nin %62.5, UreB'nin %87.5, UreA'nın %80.4 ve OMP'lerin %57.1 olduğu bildirilmiştir (156). Jafarzadeh ve ark. İran populasyonunda serum anti-CagA antikor prevalansının çocuklarda %72.8 ve yetişkinlerde %67.4 bildirmişlerdir (157). Yamoka ve ark.; tip C suşu ile enfekte hastaların ELISA serum anti-CagA antikor titrelerinin tip A suşları ile enfekte olanlara göre yüksek olduğunu, tip C suşlarının gastrik kanseri olmayan hastalara

karşı gastrik kanserli hastalarda bulunduğunu ayrıca tip C suşları ile enfekte hastaların daha ciddi atrofi (skor 3) ve düşük pepsinojen I/II oranına sahip olduklarını da bildirmişlerdir (95). Çalışmamızda ayrıca dispeptik yakınmalı hasta serumlarında anti-*H.pylori* antikorlarını saptamak için anti-*H. pylori* IgG, anti-CagA IgG ve *H. pylori* IgA/IgG ELISA testleri ile çalışıldı. Ayrıca, altın standart yöntemlere göre 89 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastanın 77(%86.5)'si anti- *H. pylori* IgG antikorları olumlu; 30 cagA PCR pozitif hastada 14 (%46.6)'ü anti-CagA IgG antikorlu olumlu, 32 cagA PCR negatif hastada 25 (%78.1)'i anti-CagA IgG antikorlu olumlu bulundu. *cagA* ve anti-CagA IgG sonuçlarına göre, ELISA anti-CagA antikor paternlerinin bizim popülasyonumuz için uygun olmadığını öneriyoruz çünkü PCR ve serolojik testler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Türkiye'de *H. pylori*'nin serolojik tanısında duyarlılık ve spesiflik düşük saptanmıştır.

EPIYA-A ve EPIYA-B bölgelerinin hücrede zayıf tirozin fosforilasyon aktivitesine sahip oldukları bilinmektedir (24, 102). Batı suşlarının içerdiği CagA proteinin sahip olduğu EPIYA-C segmentinin sayısı EPIYA-ABC'den EPIYA-ABCC'ye kadar değişiklik gösterebilir (22,95,101). Panayotopoulos ve ark. *H. pylori* klinik izolatlarında EPIYA-ABC Motifinin dominant olduğunu (yetişkinlerde %67.3 ve çocuklarda %72.1), yetişkinlerden izole edilen 10 suşun ve çocuklardan izole edilen yedi suşun EPIYA-ABCC Motifine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Çocuktan izole edilen sadece bir suşta ise EPIYA-B Motifinin eksik ve yetişkinlerden izole edilen iki suşun ise EPIYA-ABCCC ve EPIYA-ABABC Motifine sahip olduğu bildirilmiştir (7). Mohamed ve ark. Malezya etnik gruplarında, CagA aminoasit sekansında sayıları ve/veya tipleri farklı olan altı genotip bulduklarını bildirmişlerdir. CagA sekansında çoğunlukla en az üç taneden oluşan EPIYA Motifleri (EPIYA-ABD ve EPIYA-ABC) bulmuşlardır. Bazı suşların ise iki tekrar (EPIYA-AB ve EPIYA-AC) veya dört tekrara (EPIYA-ABBD ve EPIYA-ABCC) sahip olduklarını bildirmişlerdir (158). Reyes-Leon ve ark. CagA'nın üç motif, dört motif, beş motif içerdiğini ancak çoğunlukla üç EPIYA Motiften oluşan EPIYA-ABC Motifinin bulunduğunu ve sadece iki tane izolatın EPIYA-ACC Motifine sahip olduğunu saptamışlardır (10). Jones ve ark. EPIYA-ABD içeren *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının gastrik kanser ile ilişkisi olabileceğini bildirmişlerdir (159). Ferreira ve ark. *H. pylori cagA* pozitif suşlarının ve iki tane EPIYA-C Motifinden fazla içeren suşların gastrik mukozada histopatolojik sonuçlar ve gastrik atrofi, intestinal metaplazi ile ilişkisi olabileceğini bildirmişlerdir (160). Shokrzadeh ve ark. İran popülasyonunda, Batı tip *H. pylori* suşlarını bulmuşlardır (EPIYA-ABC, EPIYA-ABCC,

EPIYA-AB) ancak Doğu Asya tip EPIYA-D motifini bulamamışlardır; İran suşlarının Doğu Asya tip EPIYA Motifinden çok Batı tip EPIYA Motifi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (161). İran popülasyonunda başka bir çalışma da Dabiri ve ark. 84 hastanın (%68) *cagA* pozitif *H. pylori* ile enfekte olduklarını ve *cagA*-pozitifliğin Perslerde %65, Türklerde %73 ve diğer etnik gruplarda ise %71 olduğunu bildirmişlerdir. Bütün *cagA* genlerinin Batı CagA EPIYA Motifine (EPIYA-ABC) sahip olduğunu ve *cagA* statüsü ile hastalıklar arasında bir ilişki bulamadıklarını bildirmişlerdir (162). Li ve ark. 115 *H. pylori* enfekte hastada; çocukların %73.6' sında (39/53) ve yetişkinlerin %82.3'ünde (51/62) *cagA* pozitifliği bildirmişlerdir. Otuz dokuz *cagA* pozitif çocuğun *vacA* s1-pozitif olduğunu ve 51 *cagA* pozitif yetişkin hastanın ise 50'sinin *vacA* s1 pozitif olduğunu, ayrıca *cagA* ve *vacA* s1 prevalansı ile hem çocuklar hem de yetişkinler arasında korelasyon bulduklarını da bildirmişlerdir. *cagA* pozitif çocuklarda, EPIYA-ABD Motifinin dominant olduğu, *cagA* pozitif yetişkinlerde ise dört tip EPIYA Motif (EPIYA-ABC, ABD, ABAB ve AAD) saptamışlardır. EPIYA Motif dağılımının çocuklar ve yetişkinler arasında farklı olduğunu ve *cagA* genotip dağılımının erkek ve kadın hastalar arasında bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Çocuklarda hastalıklar ve CagA-3' bölgesi çeşitliliği arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulamamışlardır ancak EPIYA-ABD Motifinin genellikle atrofik gastrik (8/15, %53.3) ve gastrik kanser (5/7, %71.4) gibi ciddi hastalıklarda görüldüğünü bildirmişlerdir (163). Uchida ve ark. Vietnam popülasyonunda genellikle üç EPIYA Motifinden oluşan Doğu Asya Tip CagA (EPIYA-ABD) (%93, 94/103) içerdiklerini ve dört tane suşun ise üç EPIYA Motiften oluşan Batı tip CagA (EPIYA-ABC) (%4) içerdiklerini bildirmişlerdir (164). Bartchewsky ve ark. gastrik kanserli hastalarda *vacA* s1 genotipinin yüksek olduğunu ve *vacA* m1 alleli ile gastrik kanser arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, gastrik kanserli hastalarda *cagA* pozitif prevalansın yüksek olduğunu, dört tane EPIYA Motif paterni (EPIYA –AB, -ABC,-ABCC ve –ABCCC) bulduklarını ve EPIYA-ABCCC genotipi ile gastrik kanser arasında ilişki bildirmişlerdir (165). Schmidt ve ark. *cagA* gen yapısına sahip 126 izolatın %96.7'sinin EPIYA-A ve tümünün EPIYA-B içerdiklerini, fonksiyonel dispepsili Hintlilerin üçüncü motif olarak %93'ünün EPIYA-C Motifine, fonksiyonel dispepsili Çinli hastaların %91.8'inin ve Çinli gastrik kanserli hastaların %81.7'sinin EPIYA-D Motifine sahip olduklarını bildirmişlerdir (166). Çalışmamızda, dispeptik hasta popülasyonumuzda ise Batı tip EPIYA Motif (EPIYA-ABC ve EPIYA ABCC) suşları bulunmuştur. Ancak, iki tane hastamızın antrumundan izole edilen *H. pylori* suşunun EPIYA-ABC ve korpusundan izole edilen *H.*

pylori suşumuzun ise EPIYA-ABCC motifine sahip olduğu ve bu sonuç doğrultusunda, aynı hastada genetik olarak farklı olan birden fazla *H. pylori* suşu ile enfekte olduğu (miks enfeksiyon) saptanmıştır. Ayrıca NCTC 11637 standart *H. pylori* suşunda üç EPIYA C (EPIYA ABCCC) motifi, J99 suşunda ise EPIYA-BC motifi olduğu saptanmıştır. Salih ve ark. EPIYA motiflerinin her biri için spesifik dizayn edilmiş dört farklı primer kullanarak EPIYA motiflerini saptamışlardır. Endoskopi bulgularına göre duodenal ülserli, gastrik kanserli ve gastriti bulunan 96 hastada; 28 duodenal hastanın 13'ünde EPIYA-ABC, sekizinde EPIYA-ABCC, altısında EPIYA-ABCCC ve birinde hem EPIYA-ABC hem de EPIYA-ABCCCC; dokuz gastrik ülserli hastada ise, ikisinde EPIYA-ABC, beşinde EPIYA-ABCC ve ikisinde EPIYA-ABCCC; kırk gastritli hastanın ise, 35'inde EPIYA-ABC, beşinde EPIYA-ABCC motif saptadıklarını bildirmişlerdir (167).

Argent ve ark. Güney Afrika'da, dört ve altı arasında EPIYA motif içeren ve yüksek moleküler ağırlıklı CagA proteinine sahip *H. pylori* suşlarının gastrik kanserli hastalardan izole ettiklerini bildirmişlerdir (168). Doğu Asya *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının atrofik gastrit ve gastrik kanser ile ilişkisi olduğu düşünülmesine karşın farklı hastalıklar ile CagA proteini çeşitliliği arasındaki ilişki bulunamamıştır (25). Buna karşın, Choi ve ark. EPIYA motiflerinin sayısının yanı sıra CagA proteinlerinin alt tiplerinin (Doğu asya ve Batı tip) farklı gastrointestinal hastalıkların oluşumu ile ilişkisini önermektedirler. Seksen yedi *H. pylori* suşunun üç EPIYA motif (EPIYA-ABC) ve duodenal ülserli hastadan izole edilen bir suşun ise dört tane EPIYA motif (EPIYA-ABCC) içerdiğini, 76 suşun ise Doğu Asya tip CagA (EPIYA-ABD) içerdiklerini bildirmişlerdir. Ancak, Kore suşlarında CagA alt tipleri veya EPIYA motifleri ile farklı gastrointestinal hastalıklar arasında herhangi bir ilişki bildirilmemiştir (25). Taeke ve ark. metronidazol direncinin *cagA* pozitiflerden ziyade *cagA*-negatif suşlarda yüksek olduğunu ancak klaritromisin direnci ve *cagA* gen statüsü arasında bir ilişki bulamadıklarını bildirmişlerdir (169). Çalışmamızda, 89 *H. pylori* enfeksiyonu olumlu hastadan FISH çalışılan 60 hastada klaritromisin direnci %31.7 saptandı; *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliği ile antrum ve korpus klaritromisin duyarlı ve dirençli suşlar arasında anlamlı fark saptanmadı. Klaritromisin direnci ile *cagA* pozitif ve *cagA* negatif *H. pylori* suşları arasında bir ilişki olup olmadığı değerlendirildi. Bizim hipotezimizde hangi suşların (*cagA* pozitif mi yoksa *cagA* negatif mi) daha fazla klaritromisin direncine sahip olduğunu belirlemek amaçlanmıştır. Ancak, klaritromisin direnci ile *cagA* pozitif ve *cagA* negatif *H. pylori* suşları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca, dispeptik hasta grubumuzda

EPIYA motifleri ile histopatolojik olarak, klaritromisin direnci (FISH metodu ile) arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

CagA'nın C-terminal bölgesinde 16 aminoasitten (FPLRXXXXVXDLSKVG) oluşan CagA Multimerizasyon (CM) sekansı bulunmaktadır ve CagA multimerizasyonu CagA tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak kontrol edilmektedir (24, 101). CM sekansında bulunan 11 aminoasit hem Batı hem de Doğu Asya'da korunmuş olarak bulunmaktadır. Batı tip CagA (EPIYA-ABC) suşlarında her bir EPIYA-C motifi multiple CM motifine sahiptir ve yalnızca bir tane CM motifi en sondaki EPIYA-C motifinin distalinde bulunmaktadır. Ancak, Doğu Asya CagA suşlarında (EPIYA-ABD) ise tek bir CM motifi bulunur ve EPIYA-D motifinin distalinde yer almaktadır (24, 101). Sicinski ve ark. Kolombiya'dan izole edilen *H. pylori* suşlarında birden üçe kadar EPIYA-C motifi içeren EPIYA-ABC, EPIYA-ABCC, EPIYA-ABCBC, EPIYA-ABBCC veya EPIYA- ABCCC CagA paternlerini ve ayrıca hem Batı hem de Doğu Asya CM motifi içeren Kolombiyadan izole edilmiş *H. pylori* suşlarının Batı CagA-spesifik sekansı (WSS) içerdiklerini saptamışlardır (101). Suzuki ve ark. EPIYA motifinden farklı olarak yeni korunmuş bir motif (CRPIA-conserved repeat responsible for phosphorylation independent activity) bildirmişlerdir (170). CRPIA motifi CM motifi olarak isimlendirilmiştir ve Par1b'ye bağlanmaktadır. Bu motif CagA'nın C-terminalinde yer alır ve *H. pylori* enfeksiyonu patogeneğinde önemli bir rolü vardır. CRPIA Motifinin kronik *H. pylori* enfeksiyonunda kanser-ilişkili transkripsiyonel aktivasyon için önemli olabileceği bildirilmiştir (170).

Azuma ve ark. *cag* PAI'sını araştırmışlar ve filogenetik ağaç analiz sonuçlarına göre *cag* PAI genlerini Batı grubu ve Japonya grubu olarak iki major gruba ayırmışlardır. İki suşun (F79 ve OK107) orta tip olduklarını, iki Japon suşunun (F80 ve OK112) filogenetik ağaçta Batı grubunda, Doğu Asya *cagA* genom yapısına sahip suşların hepsinin de Japonya grubunda, iki orta tipin (F79 ve OK107) ve F80 hariç Batı grubundaki bütün suşların Batı tip *cagA* genotipine sahip olduklarını bildirmişlerdir. F80 suşunun ise mix-tip CagA ve mix-tip Batı ve Doğu Asya tipine sahip olduğuda bildirilmiştir (45). Çalışmamızda filogenetik analiz sonuçlarına göre altı hastanın antrum ve korpusundan izole edilen *H. pylori* suşlarının birbirinden uzak oldukları gösterilmiştir. Bu uzaklığın nedeninin *H. pylori* suşları arasındaki EPIYA motifleri, *vacA*, *cagA* genotipleri arasındaki farklılıklar olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, bazı hastaların aynı anda farklı genetik yapıya sahip *H. pylori* suşları ile enfekte

olduğu, *H. pylori* reenfeksiyonuna ve eradikasyon tedavisindeki başarısızlığında nedeni olabileceği kanısına varılmıştır.

Dođu populasyonundan izole edilen EPIYA motif sayısı fazla olan CagA pozitif suşların daha şiddetli aktif kronik gastrit ve atrofi ile ilişkili olabileceği dűřünűlmektedir (22). Çalışmamızda, *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliği ile cinsiyet arasında ilişki saptanmazken, *H. pylori* enfeksiyonu pozitif hastalarda yař ortalaması daha genç bulunmuştur. *cagA* pozitifliği ile histopatolojik bulgular arasında ۆzellikle antrum ve korpusta aktif enflamasyon ve korpusta atrofi ile ilişki bulunurken, EPIYA motif tipleri ile histopatolojik bulgular arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

cagA pozitifliği ile histopatolojik tanı arasında ise; antrumda aktif kronik gastrit ile ilişki saptanırken, korpusta herhangi bir ilişki saptanmadı. *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliği ve hastaların *cagA* pozitifliği ile antrum ve korpus klaritromisin duyarlı ve dirençli suşlar arasında ilişki saptanmadı. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun ikinci ve ۆüncü EPIYA-C segmentinin diğer hasta suşlarının ve J99'un birinci EPIYA-C segmentlerinden daha ۆnce içerdiğinden filogenetik olarak farklıdır ve sekans analizi ile gۆsterilmiřtir.

Sonuç olarak, *H. pylori* enfeksiyonu tanısında altın standart yۆntem olan kűltür sonuçlarına gۆre hasta grubumuzda *cagA* negatif ve pozitif suşlar saptanmış, anti CagA IgG ile ilişkilendirilmiş, klaritromisin direnci ile *cagA* arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır. Histopatolojik sonuçlar ile *H. pylori* suşlarının virulans ۆzellikleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır. EPIYA motif ile filogenetik analiz sonuçlarımıza gۆre hasta grubumuzda Batı tipi EPIYA motiflerinin varlığını ve hastanın antrum ve korpusunda farklı genetik ve filogenetik yapıya sahip *H. pylori* suşlarını barındırdığını saptadık. Ayrıca farklı suşların bir arada bulunabilmesi eradikasyon tedavisindeki başarısızlığın bir nedeni olarak dűřünülebilir. Tűrkiye'deki *H. pylori* prevalansı (%61.3-71.8) yakın Avrupa ۆlkeleri ile benzerdir. Ancak *cagA* prevalansı ise (%48.4) diğer Orta Dođu ۆlkelerinde olduğu gibi dűřűktür.

8. SONUC VE ÖNERİLER

H. pylori'nin genetik yapısı her suşta yaklaşık %20 oranında değişiklik gösterebilmekte olduğundan. CagA EPIYA motifleri çeşitliliğinin, *H. pylori* patogenezinde önemli bir role sahip olabileceği belirtilmektedir. Doğu popülasyonundan izole edilen EPIYA motif sayısı fazla olan CagA pozitif suşların daha şiddetli aktif kronik gastrit ve atrofi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle *H. pylori* suşlarındaki EPIYA motiflerinin sayısının ve tipinin doğru olarak belirlenmesinin kuvvetli bir prognostik araç olabileceği öngörülmekte ve EPIYA motiflerinin sayısının farklı klinik sonuçlar ile ilişkisi olabileceği belirtilmektedir. Klaritromisin, *H. pylori* eradikasyon tedavi protokolleri içinde önemli bir role sahiptir. Ancak, günümüzde klaritromisine dirençli suşlar artmakta ve eradikasyon tedavisinin başarısını azaltmaktadır. Bu nedenle popülasyonumuzdaki *H. pylori* varlığını ve ayrıca virülans paternlerinin bilinmesi gereklidir. Histopatolojik bulgularla birlikte bu verilerin birlikteliğinin önem kazanacağını düşünüyoruz. Gastroenteroloji de yapılabilecek uygulamada, biyopsi örneklerinin antrumdan alınmasının *H. pylori* tanı olasılığını arttırabileceği önerilmektedir.

Çalışmamızda *H. pylori*'nin *cagA* yönünden EPIYA motiflerinin tipini belirlemiş olmanın yanısıra gastrik karsinogenezde önemli bir rolünün saptanması için sinyal yollarının tam olarak bu suşlar üzerinde belirlenmesi amacı ile ileri çalışmalara gereksinim duyulabileceğini önermekteyiz.

9. KAYNAKLAR

1. Allen LA. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. Cell Microbiol 2007;9(4):817-828.
2. Clyne M, Dolan B, Reeves EP. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 2007;268(2):135-143.
3. O'Toole PW, Lane MC; Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. Microb Infect 2000;2(10):1207-1214.
4. Nilsson HO, Blom J, Abu-Al-Soud W, Ljungh AA et al. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol 2002;68(1):11-19
5. Demiray E, Yılmaz Ö, Şarkış C, Soytürk M ve ark. Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric bleeding. World J Gastroenterol 2006;12(26):4206-4210.
6. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clin Microbiol Rev 2006;19(3):449-490.
7. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A et al. 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 2007;45(2):488-495.
8. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10(4):720-741.

9. Zhong Q, Shao SH, Cui LL, Mu RH et al. Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*: a new insight into pathogenicity. Chin Med J 2007;120(23):2138-2142.
10. Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori* infeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007;37(2):112-117.
11. Radosz-Komoniewska H, Bek T, Jozwiak J, Martirosian G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect 2005;11(8):602-610.
12. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh Edition, USA, 2002;479-481.
13. Lehours P, Yılmaz O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007;12(1):1-3.
14. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S et al. Characterization of an *Helicobacter* environmental strain. J Appl Microbiol 2008;105(3):761-769.
15. Bruce MG, Maarros HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2008;13(Suppl 1):1-6.
16. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. Annu Rev Pathol 2006;1:63-96.
17. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Second edition. ASM Press, Washington DC 2002;339-351.
18. Attallah AM, Ismail H, Ibrahim GG, Abdel-Raouf M et al. Use of novel enzyme immunoassay based on detection of circulating antigen in serum for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11(4):775-779.

19. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastrich III Consensus Report. Gut 2007;56(6):772-781.
20. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007;20(2):280-322.
21. Jordaan M, Laurens JB. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with the (13)C-urea breath test by means of GC-MS analysis. J Sep Sci 2008;31(2):329-335.
22. Reyes-Leon A, Atherton JC, Argent RH, Puente JL et al. Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene. Infect Immun 2007;75(7):3445-3454.
23. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R 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.
24. Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Curr Opin Microbiol 2008;11(1):30-37.
25. Choi KD, Kim N, Lee DH, Kim JM et al. Analysis of the 3' variable region of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* isolated in Koreans. Dig Dis Sci 2007;52(4):960-966.
26. Argent RH, Zhang Y, Atherton JC. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. J Clin Microbiol 2005;43(2):791-795.
27. Versalovic J, Fox JG. *Helicobacter* In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology, 8th edition, USA, ASM pres, 2003. p. 915-928.
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori.

29. Demiray E. *Helicobacter pylori* ve klaritromisin direncinin parafin bloklarda floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile belirlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yüksek lisans tezi, 2006;7-52.
30. Graham SK, Graham DY. Contemporary diagnosis and management of *Helicobacter pylori*-associated gastrointestinal diseases. Second edition, USA, Handbooks in Health Care Co, 2002; 40-125.
31. Özden A. *Helicobacter pylori*'nin yüzyıllık hikayesi; İşte *Helicobacter pylori*. Ankara, Nurol Matbaacılık: Türk Gastroenteroloji Derneği yayını, 1995;1-3.
32. Lacy BE, Rosemore J. *Helicobacter pylori*: ulcers and more: the beginning of an era. J Nutr 2001;131(10):2789S-2793S.
33. Swaminathan N. Research on the geographically based genetic differences in *Helicobacter pylori* show that the stomach bacteris is intimately tied to man. World J Gastroenterol 2007;15(31):5211-5217.
34. Akyön Yılmaz Y. *Helicobacter pylori* sempozyumu kitapçığı. Ankara Üniversitesi tıp Fakültesi 2003;1-6.
35. Höcker M, Hohenberger P. *Helicobacter pylori* virulance factors-one part of a big picture. Lancet 2003; 362(9391):1231-1233.
36. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997;388(6642):539-547.
37. <http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html>.
38. Velin D, Michetti P. Immunology of *Helicobacter pylori* infection. Digestion 2006;73(2-3):116-123.

39. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical microbiology. Twenty-second edition, USA, Appleton & Lange, 2001; 421-423.
40. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infect Immun 1997;65(9):3672-3679.
41. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(3):1259-1264.
42. Azevedo NF, Pacheco AP, Keevil CW, Vieira MJ. Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. Appl Environ Microbiol 2004;70(1):490-493.
43. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S et al. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. Appl Environ Microbiol 2007;73(10):3423-3427.
44. Wu JJ, Sheu BS, Huang AH, Lin ST et al. Characterization of flgK gene and FlgK protein required for *H. pylori* colonization-from cloning to clinical relevance. World J Gastroenterol 2006;12(25):3989-3993.
45. Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Ohtani M et al. Distinct diversity of the cag pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. J Clin Microbiol 2004;42(6):2508-2517.
46. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat Rev Cancer 2004;4(9):688-694.

47. Pattis I, Weiss E, Laugks R, Haas R et al. The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* 2007;153(pt 9):2896-2909.
48. Hatekeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005;96(12):835-843.
49. Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F et al. Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun* 2000;68(11):6240-6249.
50. Lu H, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21(6):653-659.
51. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397(6715):176-180.
52. Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1984-1987.
53. Bruce MG, Maaros HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2008;13(Suppl 1):1-6.
54. Thjodleifsson B, Asbjörnsdóttir H, Sigurjonsdóttir RB, Gislason D et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* and cagA antibodies in Iceland, Estonia and Sweden. *Scand J Infect Dis* 2007;39(8):683-689.
55. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347(15):1175-1186.

56. Fujimoto Y, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H et al. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* among the population of endemic areas in Japan. *Helicobacter* 2007;12(2):170-176.
57. Lynn TV, Bruce MG, Landen M, Beller M et al. *Helicobacter pylori* infection among non-Native educators in Alaska. *Int J Circumpolar Health* 2007;66(2):135-143.
58. Kikuchi S, Dore MP. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2005;10 (Suppl 1):1-4.
59. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D et al. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production and associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):944-948.
60. Stingl K, Schauer K, Ecobichon C, Labigne A et al. *In vivo* interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Mol Cell Proteomics* 2008;7(12):2429-2441.
61. Pflock M, Kennard S, Finsterer N, Beier D. Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biotechnol* 2006;126(1):52-60.
62. Bury-Mone S, Mendz GL, Ball GE, Thibonnier M et al. Roles of alpha and beta carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease- dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. *Infect Immun* 2008;76(2):497-509.
63. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14(27):4265-4272.
64. Colbeck JC, Hansen LM, Fong JM, Solnick JV. Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2006;74(7):4375-4378.

65. Sakamoto J, Watanabe T, Tokumaru T, Takagi H et al. Expression of lewisa, lewisb, lewisx, lewis y, sialyl-lewisa, and sialyl-lewisx blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* 1989;49(3):745-752.
66. Hennig EE, Allen JM, Cover TL. Multiple chromosomal loci for the *babA* gene in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2006;74(5):3046-3051.
67. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008;12(1):30-36.
68. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol* 2002;40(1):239-246.
69. Backström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE et al. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(48):16923-16928.
70. Linden SK, Wickström C, Lindell G, Gilshenan K et al. Four modes of adhesion are used during *Helicobacter pylori* binding to human mucins in the oral and gastric niches. *Helicobacter* 2008;13(2):81-93.
71. Aspholm M, Olfat FO, Norden J, Sonden B et al. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog* 2006; 2:989-1001.
72. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergström J et al. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2005;280(15):15390-15397.
73. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006;55(6):775-781.

74. de Jonge R, Pot RG, Loffeld RJ, van Vliet AH et al. The functional status of the *Helicobacter pylori* sabB adhesin gene as a putative marker for disease outcome. *Helicobacter* 2004;9(2):158-164.
75. Goodwin AC, Weinberger DM, Ford CB, Nelson JC et al. Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology* 2008;154(Pt 8):2231-2240.
76. Cover TL. Role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in gastroduodenal disease. *J Infect Dis* 2006;194(10):1343-1345.
77. Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, Brenner L et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. *Gut* 2006; 55(9):1360-1361.
78. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008;134(1):306-323.
79. Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2005;10(Suppl 1):14-20.
80. Torres J, Backert S. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2008;13(Suppl 1):13-17.
81. Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G et al. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 1999;31(5):1537-1548.
82. de Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ et al. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 5):375-379.

83. Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T et al. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem* 2007; 282(9):6242-6254.
84. O'Brien DP, Israel DA, Krishna U, Romero-Gallo J et al. The role of decay accelerating factor as a receptor for *Helicobacter pylori* and a mediator of gastric inflammation. *J Biol Chem* 2006;281(19):13317-13323.
85. Zhang ZW, Dorrell N, Wren BW, Farthingt MJ. *Helicobacter pylori* adherence to gastric epithelial cells: a role for non-adhesin virulence genes. *J Med Microbiol* 2002;51(6):495-502
86. Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Banks D et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2006;74(12):6599-6614.
87. Geisse NA, Cover TL, Henderson RM, Edwardson JM. Targetting of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin to lipid raft membrane domains analysed by atomic force microscopy. *Biochem J* 2004;381(Pt 3):911-917.
88. Hatakeyama M, Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006;11(Suppl 1):14-20.
89. Torres VJ, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 2005;280(7):21107-21114.
90. Kim S, Chamberlain AK, Bowie JU. Membrane channel structure of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin: role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(16):5988-5991.

91. Sundrind MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of vacA effects on IL-2 secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(20):7727-7732.
92. Yokoyama K, Higashi H, Isikawa S, Fujii Y et al. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(27):9661-9666.
93. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S et al. EPIYA Motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. J Biol Chem 2005;280(24):23130-23137.
94. Evans DJ Jr, Evans DG. *Helicobacter pylori* CagA: analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of CagA as a virulence factor. Helicobacter 2001; 6(3):187-198.
95. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY et al. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. J Clin Microbiol 1998;36(8):2258-2263.
96. Karita M, Blaser MJ. Acid-tolerance response in *Helicobacter pylori* and difference between cagA+ and cagA- strains. J Infect Dis 1998;178(1):213-219.
97. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N et al. Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. Gastroenterology 1999;117(2):342-349.
98. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR et al. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. EMBO Journal 2002;22(3):515-528.

99. Hilleringmann M, Pansegrau W, Doyle M, Kaufman S et al. Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase CagA block CagA transport and cag virulence. *Microbiology* 2006;152(Pt 10):2919-2930.
100. Wessler S, Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 2008;16(8):397-405.
101. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC et al. CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(4):369-378.
102. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA-a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. *Int J Cancer* 2006;119(6):1217-1223.
103. Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF et al. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2002;277(9):6775-6778.
104. Kurashima Y, Murata-Kamiya N, Kikuchi K et al. Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA require the CagA-multimerization sequence. *Int J cancer* 2008;122(4):823-831.
105. Pillinger MH, Marjovonic N, Kim SY, Lee YC et al. *Helicobacter pylori* stimulates gastric epithelial cell MMP-1 secretion via CagA-dependent and -independent ERK activation. *J Biol Chem* 2007; 282(26):18722-18731.
106. Danese S, Papa A, Gasbarrini A, Ricci R et al. *Helicobacter pylori* eradication down-regulates matrix metalloproteinase-9 expression in chronic gastritis and gastric ulcer. *Gastroenterology* 2004;126(1):369-371.
107. Honda M, Mori M, Ueo H, Sugimachi K et al. Matrix metalloproteinase-7 expression in gastric carcinoma. *Gut* 1996; 39(3):444-448.

108. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W et al. 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
109. Hirata Y, Maeda S, Ohmae T, Shibata W et al. *Helicobacter pylori* induces IkappaB kinase alpha nuclear translocation and chemokine production in gastric epithelial cells. Infect Immun 2006;74(3):1452-1461.
110. Cho SO, Kim KH, Kim H. Extracellular signal-regulated kinase induces phosphorylation of IkappaBalpha in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. Inflammopharmacology 2007;15(1);26-30.
111. Maciorkowska E, Kaczmarek M, Panasiuk A, Kondej-Muszynska K et al. Soluble adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P-selectin in children with *Helicobacter pylori* infection. World J Gastroenterol 2005;11(43):6745-6750.
112. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Pestell RG et al. Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. Cell Microbiol 2006;8(11):1740-1752.
113. Chan AO. E-cadherin in gastric cancer. World J Gastroenterol 2006;12(2):199-203.
114. Wolfram L, Haas E, Bauerfeind P. Nickel represses the synthesis of the nickel permease NixA of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 2006;188(4):1245-1250.
115. Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007;12 (Suppl 1): 10-14.
116. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Chen CC. *Helicobacter pylori*-induced invasion and angiogenesis of gastric cells in mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. J Immunol 2005;175(12):8242-8252.

117. Ashktorab H, Frank S, Khaled AR, Durum SK et al. Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004;53:805-813.
118. Eguchi H, Carpentier S, Kim SS, Moss SF. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004;53(6):797-804.
119. Beswick EJ, Pinchuk IV, Suarez G, Sierra JC et al. *Helicobacter pylori* cagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 2006;176(11):6794-6801.
120. Sterzl I, Hrda P, Matucha P, Cerovska J et al. Anti- *Helicobacter pylori*, anti- thyroid peroxidase, anti-thyroglobulin and anti-gastric parietal cells antibodies in Czech population. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 1): S135-S141.
121. Presotto F, Sabini B, Cecchetto A, Plebani M et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric autoimmune disease: is there a link? *Helicobacter* 2003;8(6):578-584.
122. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(Suppl. 1):16-23.
123. Winn W, Allen S, Jandan W, Koneman E et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Baltimore, MD 21201, Philadelphia, PA 19106, USA, 2006;334-337.
124. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1161-1181.
125. Yin Y, He LH, Zhang JZ. Successful isolation of *Helicobacter pylori* after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2009;15(12):1528-1529.

126. Heep M, Scheibl K, Degrell A, Lehn N. Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999;37(11):3764-3766.
127. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P et al. Novel Real-Time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. J Clin Microbiol 2004;42(10):4512-4518.
128. Morales Espinosa Mdel R, Delgado Sapien G, Cravioto A. The use of microarrays for studying the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Rev Latinoam Microbiol 2003;45(1-2):24-29.
129. Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G et al. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(26):14668-14673.
130. Chen S, Li Y, Yu C. Oligonucleotide microarray: a new rapid method for screening the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* for single nucleotide polymorphisms associated with clarithromycin resistance. J Gastroenterol Hepatol 2008;23(1):126-131.
131. Wu MS, Chow LP, Lin JT, Chiou SH. Proteomic identification of biomarkers related to *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease: challenges and opportunities. J Gastroenterol Hepatol 2008; 23(11): 1657-1661.
132. Walz A, Odenbreit S, Stühler K, Wattenberg A et al. Identification of glycoprotein receptors within the human salivary proteome for the lectin-like BabA and SabA adhesins of *Helicobacter pylori* by fluorescence-based 2-D bacterial overlay. Proteomics 2009;9(6):1582-1592.
133. Kuloğlu Z, Kansu A, Kırsaçlıoğlu CT, Üstündağ G et al. A rapid lateral flow stool antigen immunoassay and (14)C urea breath test for the diagnosis and eradication of

- Helicobacter pylori* infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62(4):351-356.
134. Trevisani L, Cifala V, Fusetti N, Gilli G et al. Diagnostic accuracy of a rapid fecal test to confirm *H. pylori* eradication after therapy: prospective comparison with a laboratory stool test. *World J Gastroenterol* 2007;13(33):4484-4488.
 135. Blanco S, Forne M, Lacombe A, Prat C et al. Comparison of stool antigen immunoassay methods for detecting *Helicobacter pylori* infection before and after eradication treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61(2):150-155.
 136. Graham DY, Reddy S. Rapid detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine using immunochromatography. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(5):699-702.
 137. Schwarzer A, Lottspeich C, Rüssmann H, Ossiander G et al. Evolution of a novel rapid one-step monoclonal chromatographic immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* in stool from children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(7):475-480.
 138. Yang HR, Seo JK. *Helicobacter pylori* stool antigen (HpSA) test in children before and after eradication therapy: comparison of rapid immunochromatographic assay and HpSA ELISA. *Dig Dis Sci* 2008;53(8):2053-2058.
 139. Leal YA, Flores LL, Garcia-Cortes LB, Cedillo-Rivera R et al. Antibody-based detection tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a meta-analysis. *PLoS one* 2008; 3(11): e3751.
 140. Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J Gastroenterol* 2009;15(4):484-488.
 141. Sen N, Yılmaz Ö, Simsek İ, Küpelioglu AA ve ark. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. *Helicobacter* 2005;10(4):353-359.

142. Yilmaz O, Prouzet-Mauléon, Sen N, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in stool specimens by Real-Time PCR. XVIIIth International Workshop Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter* of the European Helicobacter Study Group, 12-14 October 2005, Copenhagen, Denmark, 10.25. *Helicobacter* 2005;10:52.
143. Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, Schütze K et al. European multicentre validation trial of two new non-invasive tests for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18(9):927-931.
144. Kuo FC, Wang SW, Wu IC, Yu FJ et al. Evaluation of urine ELISA test for detecting *Helicobacter pylori* infection in Taiwan: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2005;11(35):5545-5548.
145. Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim YJ et al. Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated Korean patients. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18(9):1584-1589.
146. Khan R, Nahar S, Sultana J, Ahmad MM et al. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(9):3567-3569.
147. Rimbara E, Nogushi N, Kawai T, Sasatsu M. Mutations in penicilin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(5):995-998.
148. Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler. *Mikrobiyol Bul* 2005;39:399-408.

149. Yılmaz Ö, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence *in situ* hybridization method in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* eradication therapy. World J Gastroenterol 2007;13(5):671-675.
150. Tajbaksh S, Samarbaf-Zadeh AR, Moosavian M. Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and histological method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples. Med Sci Monit 2008;14(9):BR183-187.
151. Şimşek İ. Asit ile ilgili sindirim sistemi hastalıkları. İzmir, 2008;127-137.
152. Drossman DA. Rome III: the new criteria. Chin J Dig Dis 2006;7(4);181-185.
153. Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T et al. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. J Biol Chem 2006;281(43):32344-32352.
154. Sezikli M, Güliter S, Apan TZ, Aksoy A et al. Frequencies of serum antibodies to *Helicobacter pylori* CagA and VacA in a Turkish population with various gastroduodenal diseases. J Clin Pract 2006;60(10):1239-1243.
155. Serin E, Yılmaz U, Künefeci G, Özer B ve ark. Serum positive cagA in patients with non-ulcer dyspepsia and peptic ulcer disease from two centers in different regions of Turkey. World J Gastroenterol 2003;9(4):833-835.
156. Yılmaz Ö, Şen N, Küpeliöğlü A, Şimşek İ. Detection of *H. pylori* infection by ELISA and westernblot techniques and evaluation of anti-CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients. World J Gastroenterol 2006; 12(33): 5375-5378.
157. Jafarzadeh A, Rezayati MT, Nemati M. Specific serum immunoglobulin G to *H. pylori* and CagA in healthy children and adults (South-east of Iran). World J Gastroenterol 2007;13(22):3117-3121.

158. Mohamed R, Hanafiah A, Rose IM, Manaf MR et al. *Helicobacter pylori* cagA gene variants in Malaysians of different ethnicity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009;28(7):865-869.
159. Jones KR, Joo YM, Jang S, Yoo YJ et al. Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. J Clin Microbiol 2009; 47(4):959-968.
160. Ferreira RM, Machado JC, Carneiro F, Figueiredo C. The number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs is associated with histological features of chronic gastritis. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16-19 May, 2009, Helsinki, Finland. P512.
161. Shokrzadeh L, Baghai K, Sahebkhitiari N, Dabiri H et al. Analysis of 3' end variable region of cagA in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian dyspeptic patients. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16-19 May, 2009, Helsinki, Finland. P804.
162. Dabiri H, Maleknejad P, Yamaoka Y, Feizabadi MM et al. Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE, oipA and vacA in different major ethnic groups in Tehran, Iran. J Gastroenterol Hepatol 2009; 24(8):1380-1386.
163. Li J, Ou Z, Wang F, Guo Y et al. Distinctiveness of the cagA genotype in children and adults with peptic symptoms in South China. Helicobacter 2009;14(4):248-255.
164. Uchida T, Nguyen LT, Takayama A, Okimoto T et al. Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population. BMC Microbiol 2009;9:175
165. Bartchewsky W Jr, Martini MR, Masiero M, Squassoni AC et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2009;44(2):153-161.

166. Schmidt HM, Goh KL, Fock KM, Hilmi I et al. Distinct cagA EPIYA motifs are associated with ethnic diversity in Malaysia and Singapore. *Helicobacter* 2009;14(4):256-263.
167. Salih BA, Bolek BK, Arikan S. DNA sequence analysis of cagA 3' motifs of *Helicobacter pylori* strains from patients with peptic ulcer diseases. *J Med Microbiol* 2010;59(2):144-148.
168. Argent R, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ et al. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2004;127(2):514–523.
169. Taneike I, Nami A, O'Connor A, Fitzgerald N et al. Analysis of drug resistance and virulence-factor genotype of Irish *Helicobacter pylori* strains: is there any relationship between resistance to metranidazole and cagA status? *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30(7):784-790.
170. Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, Fukumatsu M et al. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* 2009;5(1):23-34.

10. EK

10.1. Gönüllü Bilgilendirme Formu

Değerli Hastamız,

Sizin muayeneniz ve değerlendirilmeniz sonucunda doktorunuz tarafından endoskopi yapılması gerekli bulunmuştur. Mide mukozasına yerleşen *Helicobacter pylori* adındaki bakterinin gastrit, mide ülseri ve mide kanseri ile ilişkisi kanıtlanmıştır. Enfeksiyona neden olan bu bakterinin tanısı ve sonuçta size uygun tedavinin uygulanabilmesi için endoskopi sırasında rutin olarak alınan biyopsi örneği hızlı üreaz testi ve histopatolojik yöntemleri ile incelenecektir, ancak katılacağımız çalışmada sizin midenizdeki *Helicobacter pylori* suşunun genetik özelliklerini daha fazla tanımlamak için endoskopi sırasında midenizden 4 adet daha biyopsi alınacak ve bu biyopsiler de bakterinin araştırılması için kültür ve moleküler yöntemler uygulanarak ileri incelemeleri yapılacaktır. Bu çalışmaya sizin gibi yaklaşık 124 kişi alınacaktır. Katkıda bulunacağız bu çalışmada bakterinin genetik özelliğinin incelenmesi ile belirli bakteriyel suşları ile siz ve diğer benzer hastalarda ortaya çıkan hastalıklar arasında ilişki incelenip tedavi ve hastalığın öngörmede yarar sağlayacaktır. Bu işlemler size herhangi bir zarar vermemektedir. Testlerin sonuçları kontrol ve tedavi altında olduğunuz bölüme bildirilecektir. Sizden kabul ettiğiniz takdirde örnekler bir defa alınacaktır. Bir kez daha hastanemize gelip bize örnek vermenize gerek kalmayacaktır.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Gönüllü olarak bu çalışmada yer alan tüm hastaların kişisel bilgileri gizli tutulacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları sizden veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluştan talep edilmeyecektir. Eğer çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız ilgili bölümü imzalamanız gerekmektedir.

Gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren yukarıdaki metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik laboratuvar araştırmasına kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın:

Ad :

Soyad :

Adresi :

Telefon(Ev/Cep):

Tarih :

İmza :

Araştırma Sorumlusu:

Ad Soyad :

Telefon :

Adres :

İmza :

Tanık:

Ad Soyad :

Telefon :

Adres :

İmza :

İrtibat Kurulabilecek Telefon Numaraları:

Meryem Güvenir

0232-412-45-01

0555-625-82-79

10.2 ÇALIŞMA FORMU

Ad Soyad : **Tarih** :
Yaş : **Protokol No** :
Cinsiyet : **Patoloji No** :
Adres : **Telefon** :

§ **Hasta çalışma kriterlerine** **Uygun** **Uygun değil**

Dışlama kriterleri göz önüne alınarak dışlanan, dispeptik yakınmalı ve kanamalı endoskopi endikasyonu konulan hastalar çalışmaya alınacaktır. Dışlama kriterleri; Koagülopati, gebelik, laktasyon, malignensiler, gastrik cerrahi geçirenler, son 6 ay içinde *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisi alanlar, son 1 ay içinde antibiyotik, anti sekretuar ilaç, bizmut tuzları, sukralfat kullanan hastalar.

§ **Gönüllü bilgilendirme formu verildi mi?** **Evet** **Hayır**

§ **Mide biyopsisi alındı mı?** **Antrum** **Korpus**

§ **Hızlı Üreaz Testi**

Antrum (+) (-)

Korpus (+) (-)

Hastalardan alınan biyopsi örnekleri histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderilecektir. HLO sonuçları takip edilecektir.

§ **Histopatolojik incelemede HLO**

Antrum (+) (-)

Korpus (+) (-)

§ **Kan örneği alındı mı?** **Evet** **Hayır**



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



BİRİM / BÖLÜM : MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
SAYI : 118
KONU :

02.06.2008
İZMİR

DEKANLIK MAKAMINA

Anabilim Dalımızda görev yapmakta olan Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın yürütücüsü olduğu "*Helicobacter pylori* Çeşitli EPIYA modifiyeri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması" isimli projenin Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunda değerlendirilmesi için gereğini bilgilerinize arz ederim.


Prof.Dr.Hakan ABACIOĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Ek: Başvuru formu

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi / Inciraltı 35340-İZMİR

Tel: 0 232 4124501

Fax: 0 232 2590541

E-posta: mik.ac@deu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için Birim Sorumlusu

EX
02.06

Ek-3



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

el. : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74

Fax : 0 232 - 259 05 41

İnciraltı 35340-İzmir

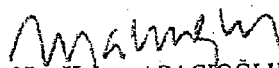
Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00/ 10054

23 HAZİRAN 2008

MIKROBİYOLOJİ VE KLİN.MİKROB. ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 20 Haziran 2008 tarih ve 256 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen: 252/2008 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın proje yöneticisi ve Meryem GÜVENİR'in sorumlusu olduğu, "Helicobacter pylori CagA EPIYA motifleri ile klaströmisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye iletilmesi hususunda gereğini rica ederim.


Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan

Ek: Etik Kurul Kararı

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 20.06.2008/256

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

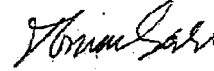
Etik Kurul Sekreteri
Hatice İGCI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 19 Haziran 2008 tarih ve 05/14/2008 no.lu toplantısında; 252/200 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın proje yöneticisi ve Meryem GÜVENİR'i sorumlusu olduğu, "Helicobacter pylori CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkinin araştırılması" isimli projede; "tanıklı eden diğer araştırmacı" ifadesinin "tanık" olarak değiştirilmesinden sonra projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

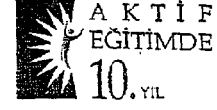


Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



BİRİM / BÖLÜM : MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ AD.
SAYI : 141
KONU :

26.06.2008
İZMİR

DEKANLIK MAKAMINA

Anabilim Dalımızda görev yapmakta olan Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın yöneticisi olduğu ve Meryem GÜVENİR'in sorumlusu olduğu "Helicobacter pylori CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması" isimli projede; "tanıklık eden diğer araştırmacı" ifadesi "tanık" olarak değiştirilerek ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğine arz ederim.

Prof.Dr.Zeynep GÜLAY
Anabilim Dalı Başkanı Vekili

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi / İnciraltı 35340-İZMİR Tel. 0 232 4124501 Fax : 0 232 2590541 E-posta : mik.ad@deu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için Birim Sorumlusu :

Ek - 4



T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Tel : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74

Fax : 0 232 - 259 05 41

İnciraltı 35340-İzmir

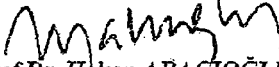
Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 10511

08 TEMMUZ 2008

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 03 Temmuz 2008 tarih ve 302 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen; 252/2008 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın proje yöneticisi ve Meryem GÜVENİR'in sorumlusu olduğu, "Helicobacter pylori CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye iletilmesi hususunda gereğini rica ederim.


Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan

Ek: Etik Kurul Kararı.

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 03.07.2008/ 302

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Üzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

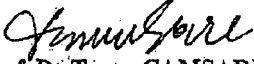
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 03 Temmuz 2008 tarih ve 31/15/2008 no.lu toplantısında; 252/2008 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın proje yöneticisi ve Meryem GÜVENİR'in sorumlusu olduğu, "Helicobacter pylori CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkisinin araştırılması" isimli; 20.06.2008 tarih ve 256 sayılı etik kurulumuz kararı ile onay alan proje ile ilgili gönderilen belgeler incelenerek, projeye dahil edilen ve çıkarılan araştırmacılar hakkında bilgi edinilmiştir.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

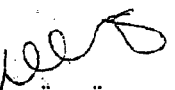
Ek: Proje yöneticisinin Etik Kurula sunduğu belgeler.

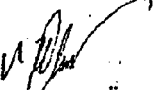

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı


Prof. Dr. Tunç ALKIN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Mustafa SEÇİL
Üye (izinli)

Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER
Üye (katılmadı)



Doç. Dr. Vesile ÖZTÜRK
Üye


Doç. Dr. M. Hakan ÖZDEMİR
Üye

Doç. Dr. Murat DUMAN
Üye (izinli)

Doç. Dr. Güven ASLAN
Üye


Yard. Doç. Dr. Murat ÖRMEN
Üye


Öğr. Gör. Uzm. Dr. Ahmet Can BİLGİN
Üye

Etik Kurul Sekreteri
Fatice İĞCI

Yunus KARSLI
Üye

ÖZGEÇMİŞ MERYEM GÜVENİR

TC Kimlik No / Pasaport No:	218006
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak. Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji A.D. İnciraltı/İZMİR 35040 İzmir/Türkiye
Telefon :	0392-7146464
e-posta :	meryemguvenir@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ	Yüksek Lisans	2010
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2007

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Vedat Özünlü Tıbbi Tahlil Laboratuvarı	K.K.T.C.	Lefkoşa	Laboratuvar	Arge Personel	2009-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Diğer

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

Düzenleme Tarihi :30/04/2010

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

YILMAZ Ö, GÜVENİR M, DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ. Immunity marker of Helicobacter pylori in adult patients with dyspepsia: Autoantibodies against parietal cells (PCA). European Helicobacter Study Group XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal. P01-11 Helicobacter 2009;14:341

PEREZ PEREZ GI, GÜVENİR M, TRAUBE L, YILMAZ Ö, OLIVARES A, RODRIGUEZ B. Identification of Eastern Asian cagA 3’ region using a single PCR technique. European Helicobacter Study Group XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal. P03-17 Helicobacter 2009;14:354.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, GÜVENİR M, DAVOUDI OSKOU EI D, YILMAZ Ö. The effect of 50 hz Electromagnetic field (emf) on Helicobacter pylori. European Helicobacter Study Group XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal. P08-09 Helicobacter 2009;14:390

GÜVENİR M, YILMAZ Ö, OLIVARES A, GONEN C, SARIOGLU S, SOYTURK M, PEREZ PEREZ GI. Identification and Characterization of CagA EPIYA Motifs in Turkish Origin Strains. European Helicobacter Study Group XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal P06-17 Helicobacter 2009;14:376

TÜRKOĞLU E, KESİCİ S, MEŞEN A, YENER E, DEMİRAY GÜRBÜZ E, GÜVENİR M, BEKMEN N, NAMLI Ş, SAĞOL Ö, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. The importance of the positivity duration for rapid urease test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection at Endoscopy Unit. European Helicobacter Study Group XXIIInd International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal. P01-21 Helicobacter 2009;14:345

DEMİRAY E , SOYTÜRK M, YILMAZ Ö, BEKMEN N, GÜVENİR M, ELLİDOKUZ H, DÖLEK D, ŞİMŞEK I . The importance of stool antigen test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection and eradication follow-up. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. May 16-19, 2008, Helsinki, Finland.

İZMİRLİ M, YETİŞ Ç, KAYALI RD, HUSSEİN ZM, HEMED SN, BEKMEN N, GÜVENİR M, OSKUEİ DD, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK I, YILMAZ Ö. Investigation of H. pylori Infection in Patients Referred to Upper Endoscopy in the Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Gastroenterology Polyclinics by the Third Year Medical School Students. European

Helicobacter Study Group XXIst International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 18-20, 2008, Riga,

BEKMEN N, DEMİRAY E, GÖNEN C, DÖLEK D, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, GÜVENİR M, ŞİMŞEK I, YILMAZ Ö. Determination of H. pylori Antigenic Frequency by Western Blot Technique in Adults Patients with Dyspepsia. European Helicobacter Study Group XXIst International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia. Helicobacter 2008;13: 452

DEMİRAY E, YILMAZ Ö, SOYTÜRK M, BEKMEN N, GÖNEN C, GÜVENİR M, SAĞOL Ö, DÖLEK D, ŞİMŞEK I. A Perspective for the Detection of H. pylori Infection by four Noninvasive Tests. European Helicobacter Study Group XXIst International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia. Helicobacter 2008;13:450

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :30/04/2010