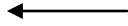




Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS TEZİ**;  
Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi kalacak



← Tez Sınavının

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**GENOTİPLERİ FARKLI HELICOBACTER PYLORİ  
KÖKENLERİNİN NÖTROFİL VE MONOSİT HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE OLUŞTURDUĞU SİTOKİN YANITLARI**

**REYHAN ÇALIŞKAN ALGINGİL**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. BEKİR S. KOCAZEYBEK**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2013**

## TEZ ONAYI

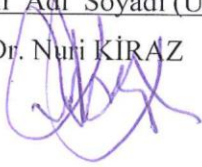
Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Reyhan ÇALIŞKAN ALGINGİL tarafından hazırlanan GENOTİPLERİ FARKLI HELİCOBACTER PYLORİ KÖKENLERİNİN NÖTROFİL VE MONOSİT HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OLUŞTURDUĞU SİTOKİN YANITLARI başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

26 / 06 / 2013

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) \_\_\_\_\_ İmzası

1.Prof. Dr. Nuri KIRAZ İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi /Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



2.Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi./Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Tez Danışmanı-Tez İzleme Komitesi Üyesi)



3.Prof. Dr. Kadir BAL İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/İç Hastalıkları Anabilim Dalı (Tez İzleme Komitesi Üyesi)



4.Doç. Dr. Hrisi BAHAR İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Tez İzleme Komitesi Üyesi)



5.Doç.Dr.Ayça SAYI YAZGAN İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen-Ed. Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Gen.Bölümü



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Reyhan Çalışkan Alıngil



## İTHAF

Canım oğlum Erdem'e ithaf ediyorum...

## TEŞEKKÜR

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nuri KİRAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Eđitimim süresince bilgi ve desteği ile hep yanımda olan, derin bilgisi, hoş görüsü ve insani özelliklerinden çok şey öğrendiğim, yaptığım tüm çalışmalarında bana katkıda bulunan, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, yetişmemde büyük emeği geçen tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Eđitimin süresince yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarımız Sayın Prof. Dr. Müzeyyen Mamal TORUN, Prof. Dr. Mustafa SAMASTI, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Prof. Dr. Murat HÖKELEK, Doç. Dr. Suat SARIBAŞ, Doç. Dr. Mustafa ASLAN, Doç. Dr. Sevgi ERGİN, Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ, Doç. Dr. Fatma KÖKSAL ve Yard.Doç.Dr. Erdal POLAT'a teşekkür ederim.

Akademik ve manevi katkılarıyla bana destek veren, laboratuvar çalışmalarının yürütülüp, değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hrisi BAHAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın klinik örneklerinin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Kadir BAL, Doç. Dr. Yusuf ERZİN ve tüm İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın deney aşamalarında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen İTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Doç. Dr. Ayça SAYI YAZGAN'a ve Yüksek Lisans Öğrencisi Emre SOFYALI, Yüksek Lisans Öğrencisi Nesteren MANSUR, Yüksek Lisans Öğrencisi Miray KARAYILAN'a teşekkür ederim.

Tüm akademik yaşantım boyunca ayrıca sosyal hayatımda da desteğini, dostluğunu, yardımını, güleryüzlülüğünü ve enerjisini esirgemeyerek beni her zaman motive etmiş olan PhD Pelin YÜKSEL'e teşekkür ederim. Tez çalışmalarım için örnek toplama aşamasındaki yardımlarından dolayı Yüksek Lisans Öğrencisi Aykut Kurt, Yüksek Lisans Öğrencisi Özge Yılmazlı ve Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma Kalaycı'ya, tez yazımı aşamasındaki desteklerinden dolayı Doktora Öğrencisi Özer AKGÜL ve Doktora Öğrencisi Tevhide ZİVER'e, ayrıca deney aşamalarımdaki hoşgörülerinden dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvar çalışanı tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Güleryüzlülüğü ile yanımda olan ve yazım aşamasında desteğini esirgemeyen eşim Selçuk Ahmet ALGINGİL'e teşekkür ederim. Ayrıca destekleri, sonsuz sabırları ve sevgilerini hayatım boyunca benden esirgemeyen aileme anlayışları için minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20900



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	Vİİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	XV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	XVİİ
ÖZET .....	XİX
ABSTRACT.....	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Tarihçe .....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	5
2.3. Sınıflandırma.....	7
2.4. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	8
2.4.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	8
2.4.2. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikler .....	8
2.4.2.1. Lipopolisakkarit (LPS).....	9
2.4.2.2. Lipid A .....	10
2.4.2.3. Dış Membran Proteinleri.....	10
2.4.2.4. Flajella.....	11
2.4.3. Genomik Özellikler.....	11
2.4.4. Biyokimyasal Özellikler .....	12
2.4.5. Üreme ve Kültür Özellikleri .....	12
2.5. Patogenez .....	14
2.5.1. Kolonizasyon Faktörleri.....	15
2.5.1.1. Hareket ve Flajella .....	15
2.5.1.2. Üreaz Enzimi ve Asit Ortama Direnç .....	15
2.5.1.3. Adezinler ve Dış Membran proteinleri .....	18

2.5.2. Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Patogenezde Rol Alan Diğer Enzimler.....	20
2.5.3. Patogenezde Rol Alan Gen Bölgeleri .....	20
2.5.3.1. cagPAI (Sitotoksin İlişkili Gen Patojenite Adası) ve cagA Geni .....	20
2.5.3.2. vacA Geni (Vakuol Oluşturucu Sitotoksin A Geni) ve VacA Proteini.....	25
2.5.3.3. babA Geni (Kan Grup Antijeni Bağlayan Adezin Geni) .....	27
2.5.3.4. iceA Geni (Epitele Temasla İndüklenen A Geni) .....	27
2.5.3.5. oipA Geni (Dış Enflamatuvar Protein A Geni).....	28
2.5.3.6. HP-NAP( <i>H. pylori</i> Nötrofil-Aktive Edici Protein) .....	28
2.6. İmmün Yanıt .....	28
2.6.1. İmmün Yanıt Mekanizması.....	28
2.6.2. İmmün Yanıtta Rol Alan Sitokinler .....	29
2.7. Yaptığı Hastalıklar .....	33
2.7.1. Akut Enfeksiyon .....	34
2.7.2. Gastrit.....	34
2.7.3. Gastrik Ülser .....	36
2.7.4. Duodenal Ülser .....	36
2.7.5. Gastrik Karsinoma .....	37
2.7.6. MALT Lenfoma.....	40
2.7.7. Gastro-özefageal Reflü Hastalığı (GÖRH).....	40
2.7.8. Fonksiyonel Dispepsi.....	41
2.7.9. Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar .....	41
2.8. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonlarında Tanı .....	41
2.8.1. <i>H. Pylori</i> Tanısında Kullanılan Klinik Örnekler.....	42
2.8.2. İnvaziv Yöntemler.....	43
2.8.2.1. Direkt İnceleme .....	43
2.8.2.2. Kültür .....	43
2.8.2.3. Histopatolojik İnceleme .....	45
2.8.2.4. Hızlı Üreaz Testi .....	46
2.8.2.5. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	47
2.8.3. İnvaziv Olmayan Yöntemler .....	48
2.8.3.1. Üre Nefes Testi(ÜNT).....	48
2.8.3.2. Serolojik Yöntemler .....	49
2.8.3.3. Dışkıda Antijen Aranması.....	50

2.8.3.4. Dışkıda DNA Aranması .....	51
2.8.3.5. Tükürük ve İdrar Testleri .....	51
2.9. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonlarında Tedavi.....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. Çalışma Alanı.....	55
3.2. Çalışma Planı .....	55
3.3. Örnek Toplama Aşaması.....	56
3.3.1. Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri .....	56
3.3.2. Örneklerin Toplanması ve Laboratuvara Taşınması.....	57
3.4. <i>H. pylori</i> Kültürü Aşaması .....	57
3.4.1. <i>H. Pylori</i> Kültürü İçin Kullanılan Besiyerleri ve Reaktifler.....	57
3.4.1.1. Brucella Broth Besiyeri (%20 Glukozlu).....	57
3.4.1.2. <i>Helicobacter</i> Agar Besiyeri.....	58
3.4.1.3. Üre Agar Besiyeri .....	58
3.4.1.4. Oksidaz Deneyi .....	59
3.4.1.5. Katalaz Deneyi .....	59
3.4.2. <i>H. pylori</i> Kültürü.....	59
3.4.3. <i>H. pylori</i> Kültüründen Stok Hazırlanması .....	60
3.4.3.1. Brucella Broth Besiyeri.....	60
3.4.3.2. <i>H. pylori</i> 'nin Stoklanması için Brucella Broth Besiyeri (%20 Gliserollü) ..	61
3.4.4. <i>H. pylori</i> Kültüründen Ekstarksiyon İşlemi İçin Örnek Hazırlanması.....	61
3.5. <i>H. pylori</i> 'ye Dönük Moleküler Deney Aşamaları.....	61
3.5.1. <i>H. pylori</i> DNA ekstraksiyonu .....	62
3.5.2. <i>H. pylori</i> ureC Gen Bölgesinin Amplifikasyonu .....	63
3.5.3. <i>H. pylori</i> Genotiplendirme Aşamaları.....	64
3.5.3.1. <i>H. pylori</i> Genotiplendirme Aşamaları İçin Kullanılan Sarf Malzemelerininin ve Solüsyonların Hazırlanması .....	64
3.5.3.2. <i>H. pylori</i> cagA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu .....	65
3.5.3.3. <i>H.pylori</i> vacA s1/s2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	66
3.5.3.4. <i>H.pylori</i> vacA m1/m2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	67
3.5.3.5. <i>H.pylori</i> babA2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	68
3.5.3.6. Amplifiye Edilen Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi ..	69

3.5.3.7. Amplifiye Edilen Ürünlerin % 12'lik Poliakrilamid Jel ile Görüntülenmesi .....	71
3.5.3.8. Dizileme Reaksiyonu .....	72
3.6. Ko-Kültür Aşamaları .....	73
3.6.1. Ko-kültür Yapılacak <i>H. pylori</i> Kökenlerinin Seçilmesi.....	73
3.6.2. Hücre Hattı.....	73
3.6.2.1. THP-1 ve HL-60 Hücre Hattı Stoklarının Açılması .....	73
3.6.2.2. THP-1 ve HL-60 Hücrelerinin 6-Well'e Aktarılması .....	74
3.6.2.3. <i>H. pylori</i> Kökenlerinin Hazırlanması .....	74
3.6.2.4. <i>H. pylori</i> THP-1 ve Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücreleri ile Ko-Kültürü .....	75
3.7. Sitokin Yanıtının Saptanması .....	75
3.8. İstatistiksel Yöntemler .....	77
4. BULGULAR.....	78
4.1. <i>H. pylori</i> 'ye Dönük Moleküler Deney Sonuçları.....	80
4.1.1. <i>H. pylori</i> ureC Gen Bölgesi.....	80
4.1.2. <i>H. pylori</i> cagA Gen Bölgesi.....	83
4.1.3. <i>H. pylori</i> vacA Gen Bölgesi.....	83
4.1.4. <i>H. pylori</i> babA2 Gen Bölgesi.....	85
4.1.5. <i>H. pylori</i> cagA, vacA ve babA2 Gen Bölgelerinin Birliktelikleri .....	85
4.1.6. <i>H. pylori</i> Kökenlerinin Genotipleri.....	88
4.2. Ko-Kültür ve Sitokin Yanıtı Sonuçları .....	89
4.2.1. THP-1 Hücresinde IL-1 $\beta$ Yanıtı .....	92
4.2.2. THP-1 Hücresinde IL-6 Yanıtı .....	93
4.2.3. THP-1 Hücresinde IL-8 Yanıtı .....	94
4.2.4. THP-1 Hücresinde IL-12 Yanıtı .....	95
4.2.5. THP-1 Hücresinde TNF- $\alpha$ Yanıtı.....	96
4.2.6. THP-1 Hücresinde IL-10 Yanıtı .....	98
4.2.7. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-1 $\beta$ Yanıtı .....	99
4.2.8. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-6 Yanıtı .....	100
4.2.9. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-8 Yanıtı .....	101
4.2.10. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-12 Yanıtı .....	103
4.2.11. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde TNF- $\alpha$ Yanıtı.....	104

4.2.12. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-10 Yanıtı .....	105
4.2.13. Genotiplere Göre Salınan Sitokin Düzeyleri ve Histopatolojik Veriler .....	107
5. TARTIŞMA .....	109
KAYNAKLAR .....	127
FORMLAR .....	150
ETİK KURUL KARARI .....	151
ÖZGEÇMİŞ .....	152

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>Helicobacter</i> türleri ve konak tropizmi(2).....	7
Tablo 2-2: <i>H. pylori</i> enfeksiyonunun varlığını göstermek için kullanılan testler(28) ....	42
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve hedef gen uzunlukları(65) .....	62
Tablo 3-2: <i>H. pylori</i> ureC gen bölgesinin tesbiti için kullanılan real-time PCR reaksiyonu hacimleri.....	63
Tablo 3-3: <i>H. pylori</i> cagA gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri .....	65
Tablo 3-4: <i>H. pylori</i> vacAs1/s2 gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri .....	66
Tablo 3-5: <i>H. pylori</i> vacAm1/m2 gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimler .....	67
Tablo 3-6: <i>H. pylori</i> babA2 gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri .....	69
Tablo 4-1: Hasta grubunun demografik verileri, <i>H. pylori</i> kültürü, üreaz, oksidaz, katalaz deneylerinin sonuçları .....	79
Tablo 4-2: Hastalara ait <i>H. pylori</i> kültür sonuçları ve demografik verilerin endoskopik tanılarına göre dağılımı.....	80
Tablo 4-3: <i>H. pylori</i> DNA'sı saptanan kökenlerde <i>H. pylori</i> cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2, babA2 gen bölgeleri sonuçları ve genotipleri .....	82
Tablo 4-4: Kültürde üreyen <i>H. pylori</i> kökenlerinin <i>H. pylori</i> vacA s1/s2 ve vacAm1/m2 allellerinin dağılımı.....	85
Tablo 4-5: <i>H. pylori</i> cagA ve vacA gen bölgelerinin birlikte dağılımı.....	86
Tablo 4-6: <i>H. pylori</i> cagA ve babA2 gen bölgelerinin birlikte dağılımı .....	86
Tablo 4-7: <i>H. pylori</i> babA2 ve vacA gen bölgelerinin birlikte dağılımı .....	87
Tablo 4-8: <i>H. pylori</i> cagA ve babA2 gen bölgelerinin <i>H. pylori</i> vacA s1/s2 ve m1/m2 allellerine göre dağılımı .....	87
Tablo 4-9: <i>H. pylori</i> genotiplerinin içerdikleri gen bölgeleri .....	88
Tablo 4-10: <i>H. pylori</i> genotiplerinin dağılımı .....	89
Tablo 4-11: Ko-kültür için seçilen hastaların <i>H. pylori</i> genotipleri, hasta numaraları, endoskopik tanıları ve patolojik verileri .....	90

Tablo 4-12: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-1 $\beta$ düzeyleri.....	92
Tablo 4-13: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-6 düzeyleri.....	94
Tablo 4-14: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeyleri.....	95
Tablo 4-15: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-12 düzeyleri.....	96
Tablo 4-16: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan TNF- $\alpha$ düzeyleri.....	97
Tablo 4-17: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeyleri.....	98
Tablo 4-18: <i>H. pylori</i> genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-1 $\beta$ düzeyleri .....	100
Tablo 4-19: <i>H. pylori</i> genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-6 düzeyleri .....	101
Tablo 4-20: <i>H. pylori</i> genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeyleri .....	102
Tablo 4-21: <i>H. pylori</i> genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-12 düzeyleri .....	104
Tablo 4-22: <i>H. pylori</i> genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan TNF- $\alpha$ düzeyleri.....	105
Tablo 4-23: <i>H. pylori</i> genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeyleri .....	106

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>H. pylori</i> kolonilerinin görünümü(34).....	13
Şekil 2-2: <i>H. pylori</i> 'nin gastrik mukozaya kolonizasyon modeli(9) .....	16
Şekil 2-3: <i>H. pylori</i> üreaz aktivitesi(2) .....	16
Şekil 2-4: <i>H. pylori</i> ' nin üreaz enzimi operonu(9) .....	17
Şekil 2-5: Sırasıyla Giemsa ve Warthin-Starry gibi özel boyama teknikleriyle.....	46
Şekil 4-1: 1 numaralı hastaya ait biyopsi örneğinin Gram boyamasında <i>H. pylori</i> 'nin mikroskopik görüntüsü (x100) ve <i>Helicobacter</i> agar besiyerinde üreyen <i>H. pylori</i> kolonileri.....	78
Şekil 4-2: Real-time PCR yöntemiyle erime eğrisi analizi ile <i>H. pylori</i> ureC gen bölgesine ait pozitif saptanan kökenlerin görüntüsü.....	81
Şekil 4-3: Klasik PCR yöntemi ile saptanan <i>H. pylori</i> cagA gen bölgesine ait agaroz jel görüntüsü .....	83
Şekil 4-4: Klasik PCR yöntemi ile saptanan <i>H. pylori</i> vacAs1/s2 gen bölgelerine ait PAG görüntüsü .....	84
Şekil 4-5: Klasik PCR yöntemi ile saptanan <i>H. pylori</i> vacAm1/m2 gen bölgelerine ait agaroz jel görüntüsü.....	84
Şekil 4-6: Klasik PCR yöntemi ile saptanan <i>H. pylori</i> babA2 gen bölgesine ait agaroz jel görüntüsü .....	85
Şekil 4-7: <i>H. pylori</i> genotiplerinin THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleri ile ko-kültürü sonucunda salgılanan sitokinlerin sonuçlarının FCAP Array v3 software ile analizi.....	91
Şekil 4-8: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre THP-1 hücrelerinden salınan IL- $\beta$ düzeyleri.....	93
Şekil 4-9: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre THP-1 hücrelerinden salınan IL-6 düzeyleri.....	94
Şekil 4-10: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre THP-1 hücrelerinden salınan IL-8 düzeyleri....	95
Şekil 4-11: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre THP-1 hücrelerinden salınan IL-12 düzeyleri...	96
Şekil 4-12: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre THP-1 hücrelerinden salınan TNF- $\alpha$ düzeyleri.	97
Şekil 4-13: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre THP-1 hücrelerinden salınan IL-10 düzeyleri..	99
Şekil 4-14: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL- $\beta$ düzeyleri .....	100
Şekil 4-15: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-6 düzeyleri .....	101



Şekil 4-16: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-8 düzeyleri .....	103
Şekil 4-17: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-12 düzeyleri .....	104
Şekil 4-18: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan TNF- $\alpha$ düzeyleri .....	105
Şekil 4-19: <i>H. pylori</i> genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-10 düzeyleri .....	106

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- BabA: Kan grup antijeni bağlayan adezin
- cag PAI: Sitotoksin ilişkili gen patojenite adası
- CLSI: The Clinical and Laboratory Standarts
- COX-2: Siklooksijenaz 2
- DC-SIGN: Dendritik hücreye özgül ICAM-3 bağlayan non-integrin
- DMSO: Dimethyl sulfoxide
- FBS: Fetal bovine serum
- FDA: Food and Drug Administration
- GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
- GÖRH: Gastro-özefageal Reflü Hastalığı
- HP-NAP: H. pylori nötrofil-aktive edici protein
- HpSA: H. pylori Stool antigen test
- IACR: International Agency for Cancer Research
- ICAM: İntrasellüler adezyon molekülü
- IFN: İnterferon
- IL: İnterlökin
- iceA geni: Epitele Temasla İndüklenen A Geni
- LPS: Lipopolisakkarit
- MALT: Mukoza ile ilişkili lenfoid doku
- MHC: Major doku uygunluk kompleksi
- NAAT: Nükleik asit amplifikasyon testleri
- NF-κB: Nükleer faktör kappa B
- NOS: nitrik oksid radikalleri
- OipA: Dış enflamatuar protein A
- ORF: Open reading frame
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PPI: Proton pompası inhibitörü
- SabA: Sialik asit bağlayan adezin

SH2: Src homoloji

SHP-2: Src homoloji 2 fosfataz

TGF- $\beta$ : Transforme edici büyüme faktörü

TNF: Tümör nekroz faktörü

T4SS: Tip-IV sekresyon sistemi

ureA: Üreaz A

ÜNT: Üre Nefes Testi

VacA: Vakuol oluşturucu sitotoksin A

## ÖZET

Algingil, R.Ç. Genotipleri Farklı *Helicobacter pylori* Kökenlerinin Nötrofil Ve Monosit Hücre Kültürlerinde Oluşturduğu Sitokin Yanıtları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.2013.

Anahtar Kelimeler : *Helicobacter pylori*, cagA, vacA, babA, sitokin.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20900

*Helicobacter pylori* gastrit, peptik ülser, gastrik kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilen Gram negatif bir bakteridir. *H.pylori*'nin gastrik mukozaya kolonizasyonunda ve patogenezinde özellikle cagPAI, vacA ve babA gibi virulans faktörleri rol almaktadır. Kolonizasyonla aktive olan immün sistem hücreleri ve salgılanan sitokinler de oldukça önemli rol oynamaktadır. Farklı coğrafi bölgelerde farklı genotiplerdeki *H.pylori* kökenlerine bağlı olarak gastrik-patolojilerin şiddeti değişmektedir. Biz de bu bağlamda çalışmamızda, farklı genotiplerin etkisiyle oluşabilecek sitokin yanıtlarındaki farklılığa bağlı olarak farklı genotip-sitokin düzeyi ilişkisinin *H.pylori*'nin patogenezindeki rolünü irdelemeyi amaçladık.

Bu amaçla dispeptik şikayetli 159 hastanın mide-biyopsi örneklerinden üretilen 51 *H.pylori* kökeninden prospektif-randomize olarak seçilen 21 *H.pylori* kökeni çalışmaya alındı. Bu kökenlerde ureC, cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2 ve babA2 genleri araştırıldı. *H.pylori* ureC geni saptanan kökenler cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2 ve babA2 genlerini farklı paternlerde taşımalarına göre farklı genotipler olarak sınıflandırıldı. Sınıflandırılan kökenler arasından her genotip için bir *H.pylori* kökeni randomize seçilerek in-vitro ortamda THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış/HL-60 hücreleri ile ko-kültürü yapıldı ve salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 düzeyleri araştırıldı.

Çalışmaya aldığımız *H.pylori* kökenlerinde 1.genotip *H.pylori*: cagAvacAs1m2, 2.genotip *H.pylori*: cagAvacAs1m1, 3.genotip *H.pylori*:cagAvacAs1m2babA2, 4.genotip *H.pylori*: vacAs2m2, 5.genotip *H.pylori*: cagAvacAs2m2 genleri saptanarak farklı genotipler olarak sınıflandırıldı.1-5.genotip THP-1 hücresinde; negatif kontrole göre IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 salınımını çok ileri derecede anlamlı olarak(p<0,001) (5.genotip/IL-8 için p<0,05) yükselttiği saptanırken, IL-12 yanıtı ise anlamsızdı(p>0,05). Farklı genotiplerin bu hücrelerde oluşturduğu IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 yanıtları açısından en kuvvetli yanıtı 5.genotipteyken, en kuvvetli IL-8 yanıtı ise 1.genotipteydi. Farklı genotiplerin nötrofile farklılaştırılmış/HL-60 hücresinde; 4.genotipin IL-6 salınımını, 3. ve 4.genotipin IL-8 salınımını negatif kontrole göre çok ileri derecede anlamlı olarak (p<0,001) yükselttiği saptanırken, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 yanıtı anlamsızdı(p>0,05). Farklı genotiplerin bu hücrelerde oluşturduğu IL-6 yanıtı sadece 4.genotipteyken, salınan IL-8 düzeyi ise 4.genotipte 1.sırada, 3.genotipte 2.sırada saptandı.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler bize genotip-sitokin düzeyi ve histopatoloji ilişkisinde konak genetik faktörlerine bağlı olarak genotipe spesifik immün yanıtın şiddetinin farklı olabileceğini düşündürse de gastroduedonal patolojik ilişkiye dönük prospektif yeni çalışmalar yapılmasının gerektiğini inanıyoruz.

## ABSTRACT

Algingil RC. Cytokine responses were produced in the cell cultures of neutrophils and monocytes by different genotype of *Helicobacter pylori* strains. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. İstanbul. 2013.

Key Words: *H. pylori*, cagA, vacA, babA, cytokine

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 20900

*Helicobacter pylori* is a gram-negative bacteria associated with diseases such as gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. Virulence factors especially like cagPAI, vacA and babA play a role on *H.pylori* colonization of the gastric mucosa and pathogenesis. Also, immune system cells that are activated with colonization and secreted cytokines play a prominent role. Gastric-pathological severity changes depending on the origins of the different genotypes of *H.pylori* in different geographical regions. So, in this context we aimed to analyze the relationship between different genotype and cytokine levels that may occur due to different genotypes depending on differences in cytokine responses on the role of *H.pylori* pathogenesis.

For this purpose, twenty one *H.pylori* strains prospective- randomly selected for this study from fifty one *H.pylori* strains that generated stomach's biopsy samples from 159 dyspeptic complaint patients. ureC, cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2 and babA2 genes of these strains were investigated. ureC gene of *H.pylori* strains were classified different genotypes according to carrying different patterns of cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2 and babA2 genes. Whether a *H.pylori* strain were randomly selected for each genotypes from classified strains were co-cultured with THP-1 and neutrophil-differentiated HL-60 cells in vitro, and secreted IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 levels were determined.

In the *H.pylori* strains that we studied, the genes determining in different genotypes were classified as; 1.*H.pylori* genotype: cagAvacAs1m2, 2.genotype *H.pylori*: cagAvacAs1m1, 3.genotype *H.pylori*: cagAvacAs1m2babA2, 4.genotype *H.pylori*: vacAs2m2, 5.genotype *H.pylori*: cagAvacAs2m2. According to negative control, 1-5 genotype was very highly significant raised the IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 secretion(p <0.001) (5.genotip/IL- 8, p <0.05) in THP-1 cell, IL-12 was not significant in response(p>0.05). IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 responses were formed by different genotypes in these cells and the strongest response was in 5.genotype, the most potent IL-8 response was in 1.genotype. In the neutrophil-differentiated HL-60 cells of different genotypes; whereas the release of IL-6 from 4.genotype and secretion of IL-8 from 3-4.genotype were significantly(p<0.001) raised; IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 response was not significant (p> 0, 05). While IL-6 response in these cells of different genotypes generated only in 4. genotype, the level of secreted IL-8 in 4. genotype was first and in 3. genotype was second row.

Whereas the data obtained from this study leads to think that host genetic factors may vary depending on the severity of the genotype-specific immune response in the level of cytokine genotype relation to histopathology, we believe that new prospective studies should be conducted looking to gastroduodenal pathology relation.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*H. pylori* gastrik mukozada kolonize olan hareketli, spiral şekilli, mikroaerofilik Gram negatif bir bakteridir(1,2,3,4,5,6). Genellikle çocukluk çağında kazanılan ve tedavi edilmezse ömür boyu midede kolonize olabilen *H. pylori*'nin gastrit, peptik ülser, mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoması ve gastrik kanser gibi hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir.(7) Gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı % 70-90 iken, gelişmiş ülkelerde ise bu oran % 25-50 civarındadır ve insandan insana bulaş birincil bulaş yoluken, fekal-oral ya da oral-oral yolla da bulaşabilmektedir(6,8). Midenin kronik *H. pylori* ile enfeksiyonu gastroduodenal hastalıkların gelişiminde major risk faktörü olarak tanımlanırken *H. pylori* "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından Sınıf I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır(2,9).

Asit pH'ya sahip mide lümeninde ancak birkaç dakika canlı kalabilen *H. pylori*, hızlı hareketi ve üreaz enzimi sayesinde yaşayabileceği pH'ya sahip mukus tabakasına ulaşmaktadır. Üreaz enzimi ile gastrik epitel hücrelerinden salınan üreyi parçalayarak amonyak oluşturmaktayken, bu amonyak bulutu içerisinde yaşayabileceği pH ortamını sağlamaktadır(8,10).

*H. pylori*'nin gastrik mukozaya kolonizasyonunda en önemli rolü olduğu bilinen üreaz enzimi dışında sitotoksin ilişkili gen patojenite adası (cag PAI), vakuol oluşturucu sitotoksin (VacA), kan grup antijeni bağlayan adezin (BabA), nötrofil-aktive edici protein (HP-NAP) ve dış enflamatuar protein A (OipA) gibi sahip olduğu birçok virulans faktörü enfeksiyonun patogenezinde rol oynamaktadır (8). Bu virulans faktörler arasında en önemli rolü üstlenen cagPAI'de yer alan cagA gen bölgesinin kodladığı CagA proteini *H. pylori*'ye bağlı gelişen bir çok gastrik patoloji ile ilişkilendirilmişken bu gen bölgesinde yer alan ve EPIYA motifi olarak adlandırılan bölgenin coğrafi olarak farklı konumlardaki ülkelerde görülen enfeksiyon şiddetindeki farklılık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca vacA gen bölgesinin kodladığı VacA proteini de *H. pylori*'ye bağlı gastrik patolojilerin oluşumunda önemli olan gastrik epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve bu hücrelerde apoptozisten sorumlu tutulmaktadır. BabA proteini ise *H. pylori* enfeksiyonlarında gastrik epitel hücrelerine bağlanarak kolonizasyonda ve dolayısıyla CagA gibi primer virulans faktörün hücreye aktarılmasında önemli rol üstlenmektedir(6).

*H. pylori*'nin gastrik mukozaya kolonizasyonu ile birlikte T lenfositlerinin, plazma hücrelerinin, mononükleer fagositlerin ve nötrofillerin infiltrasyonu indüklenirken, interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-8, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interferon gamma (IFN $\gamma$ ) gibi proenflamatuar sitokinlerin ekspresyonu stimüle olmaktadır(11,12,13,14,15,16,17,18). *H. pylori* ile enfekte bireylerin büyük çoğunluğunda spesifik hücre ve humoral immün yanıt gelişmesine rağmen persistan enfeksiyon meydana gelmekte ve *H. pylori*'nin tam olarak ortadan kaldırılamamasının konaktaki yetersiz immün yanıtın yanı sıra, bakterinin virülans faktörlerine ve immün yanıtın kaçış stratejilerine bağlı olabileceği bilinmektedir(11). Farklı enflamatuar sürece bağlı olarak özellikle değişik toplumlarda görülen *H. pylori*'ye bağlı gelişen farklı gastrik patolojilerin şiddetindeki çeşitliliğin farklı genotiplerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir(19,20).

Bu ilişkiden yola çıkarak çalışmamızda; asemptomatik gastritten, gastik kansere kadar geniş bir yelpazede ciddi hastalık tablolarının oluşmasında rol alan *H. pylori*'nin sahip olduğu birçok gen bölgesi arasından *cagA*, *vacAs1/s2*, *vacAm1/m2* ve *babA2* gen bölgelerini saptayarak, bu gen bölgelerini farklı şekillerde içermelerine göre belirlenen farklı genotiplerin in-vitro ortamda nötrofil ve makrofaj öncül hücreleri olan monosit hücrelerinde, *H. pylori*'nin patogenezinde rolü olan proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtlarının tespit edilmesiyle *H. pylori*'nin patogenezinde farklı genotipler ve bu sitokinler arasındaki ilişkinin irdelenmesini amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Helicobacter pylori*; tüm bakteriyel enfeksiyonların içinde en fazla prevalansla, dünya popülasyonunun yarısından fazlasında görülen ve gastrik mukozayı enfekte eden Gram negatif, spiral şekilli bir bakteridir. Enfekte insanların % 85-95’inde her hangi bir klinik yakınmaya yol açmadan midenin antrum ve/veya korpus bölgelerinde, mukus tabakası içerisindeki glikozillenmiş yapılara bağlanarak, kolonize olmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonları genellikle asemptomatiktir, fakat enfekte kişilerde yaklaşık olarak %10-15 oranında peptik ülser, gastrik lenfoma, MALT lenfoma ve gastrik adenokarsinoma gibi gastrik hastalıklar gelişebilmektedir(21).

### 2.1. Tarihçe

*H. pylori*’ye bağlı gastroduodenal hastalıkların tanımlanması tıp tarihinde çok eski zamanlara kadar uzanmaktadır. Hipokrat’ın “epigastrik yanma ve şişlik” olarak tanımladığı gastroduodenal hastalıkların etyolojisini, İbni Sina “yemek ile gastrik ağrı” olarak tanımlamış, Donati M. (1586) ülserli hastalarda mide asidine dikkat çekmiştir. Bir bakteri ile gastrik yakınmalar arasındaki olası ilişki ilk kez Alman bakteriyolog Bottcher G. ve Fransız Letulla M. tarafından ileri sürülmüştür. Bu araştırmacılar mide biyopsi örneklerinde ülser tabanında ve kenarlarında gördükleri, fakat üretmedikleri bakterileri tarif etmişlerdir. Jaworski W 1889 yılında, spiral şekilli organizmaları; otopsi yapılan kişilerin mide yıkıntı sularının sedimentinde tanımlamış ve gastrik patoloji ile ilişkili olduklarını söyleyerek bu bakterileri *Vibrio regula* olarak adlandırmıştır(2). İtalyan bilim adamı Giulio Bizzozero, 1892 yılında köpeklerin ülseratif lezyonlu mide biyopsi örneklerinde bugün *Helicobacter canis*, *Helicobacter felis* veya *Helicobacter heilmannii* olarak tanımlanan spiral şekilli bakterileri ve üreaz aktivitelerini tarif etmiştir.(2,22) Krienitz W, 1906 yılında mide kanseri olan insanların biyopsi örneklerinde benzer mikroorganizmaları göstermiştir. Schwartz K. 1910 yılında “Asit yoksa, ülser yok - No acid, no ulcer” aforizmasını ortaya atarak, gastroduodenal hastalıkların patofizyolojisinde, tedavi protokollerini de uzun yıllar etkileyecek olan yeni bir tartışmayı başlatmıştır. Buna bağlı olarak gastrit tedavisinde 1915 yılından itibaren anti-asitler kullanılmaya başlanmıştır. Penisilinin keşfi ile Lieber C. ve Lefevre



A. 1957'de antibiyotiklerin gastrik ürenin amonyağa dönüşümünü engellediği için tedavide kullanılabileceklerini bildirmişlerdir. Yine 1957'de Lykoudis J. önce kendisindeki peptik ülseri tedavi etmek için antibiyotik kullanmış, başarılı olunca 22.453 peptik ülserli hastayı antibiyotik kullanarak tedavi ettiğini bildirmiştir. Steer HW ve Colin J 1975'de midedeki ülseratif lezyonlarda spiral bakterileri göstermişler, fakat mide asitinden dolayı bu bakterileri üretememişlerdir(2).

Robin Warren ve Barry J. Marshall *H. pylori*'yi kültür ortamında ilk üretebilen araştırmacılar olarak, yaklaşık 4 yıl süren çalışmalarını 1983 yılında Lancet dergisinde yayınlanan makaleleri ile Tıp Dünyasına duyurmuşlardır.(2,6,22) Barry Marshall ve R. Warren gastrik biyopsi örneklerinin histolojik incelemelerinde gördükleri basillerin, Gram negatif kıvrımlı *Vibrio*'lara benzemeleri nedeni ile bakterinin izolasyonu için *Campylobacter* türlerinin izolasyonunda kullanılan yöntemleri kullanmışlardır. Selektif besiyerlerine ekilen biyopsi örneklerini mikroaerofilik şartlarda, *Campylobacter* türleri için geçerli olan 48 saat inkübasyona bırakmışlardır. İlk yaptıkları 30 kültür denemesi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Ancak, Paskalya tatili nedeniyle, kültürlerden birisi 5 gün süren inkübasyon sonunda besiyerinin yüzeyinde spiral şeklindeki mikroorganizmalara ait gözle görünür koloniler oluşmuştur(23). Bundan sonra 11 hastanın daha biyopsi örneklerinde spiral mikroorganizmaları üreten araştırmacılar günümüzde *H. pylori* olarak tanımladığımız bu bakteriyi *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırmışlardır(23). Warren ve Marshall yayınladıkları makalede, mide ülseri ve gastrit gelişimindeki asıl faktörün bu bakterilerin enfeksiyonu olduğunu ve daha önce sanıldığı gibi stres veya baharatlı yemeklerle bir ilişki olmadığını ileri sürmüşlerdir. Devam eden çalışmalarında biyopsi örneklerinden elde ettikleri ve kültür ortamında ürettikleri bakteri süspansiyonunu içerek Marshall, Koch postulatını gerçekleştirmiş, inokülasyondan sonra gastrik ağrı ve yanma şikayetlerinin arttığı, klinik ve histopatolojik bulgularla akut yüzeysel gastrit ile uyumlu tablonun geliştiği, gastik biyopsi örneklerinde de akut enflamatuvar cevabın başladığı tespit edilmiştir. Marshall, bizmut tuzları ve metronidazole ile 14 gün süren tedaviyle kendi kendini tedavi ederek Koch postulatını tamamlamıştır(22). Gastrik mukozada kronik süperfisial gastrit ile uyumlu enfamasyonun ve özellikle de kronik aktif gastrit için karakteristik olan PMNL infiltrasyonunu birlikteliğini vurgulayan araştırmalarla, spiral şekilli bu bakterilerle gastroduodenal patoloji arasında ilişkili olduğu açıkça ortaya konulmuştur(23). Bu

önemli çalışmalar, Marshall ve Warren'e 2005 yılında "Nobel Tıp" ödülü kazandırmıştır(2).

Kültürde üretilen kolonilerden yapılan identifikasyon çalışmalarında bakteri, morfolojik özellikleri ile *Campylobacter*'lere benzemesinden dolayı *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırılırsa da, 1989 yılında SC Goodwin'in, 16S rRNA'sının dizi analizi çalışmaları, nükleik asit hibridizasyon profilleri, büyüme özellikleri, yağ asidi profilleri ve enzimatik aktivitelerinin tespitine yönelik çalışmaları sonunda bu mikroorganizmaların benzer fenotipik özelliklere sahip *Campylobacter*, *Flexispira* ve *Wolinella* cinslerinden birine ait olmadığını göstermiştir(2). Bakterinin helikal şeklinden ve sıklıkla midenin pilor bölgesinden izole edilmesinden ötürü yeni bir cins ait olduğu tespit edilerek bu yeni cins *H. pylori* olarak adlandırılmıştır(2,22). *H. pylori*'nin yapılan çalışmalarda, bakterinin gastrik kolonizasyonu ile MALT ve gastrik adenokarsinomalar lenfoma arasındaki ilişki gösterilmiş, Dünya Sağlık Örgütü'nün bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (International Agency for Cancer Research) 1994 yılında ilk defa bir bakteriyi Tip I karsinojen olarak sınıflandırmıştır(2,23). Yine 1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü konsensusunda *H. pylori*'nin peptik ülser hastalığının en önemli nedeni olduğunu bildirilmiş ve ülserli hastalarda bu mikroorganizmanın eradikasyonu için antibakteriyel tedavi rejimleri önerilmiştir(23).

## 2.2. Epidemiyoloji

*H. pylori*'nin ilk mikroorganizmalar kadar eski ve insanoğlunun evrimsel olarak ayırma uğradığı yıllardan çok daha önce, yaklaşık 100 milyon yıl önce, ilk primatlarda ve büyük memelilerde mide mukozasında yerleşen ve florayı oluşturan temel bakteriler arasında yer aldığı düşünülmektedir. Kolomb öncesi modern dünya ile temasları olmayan yerleşik Güney Amerika yerlilerinden izole edilen kökenlerle yapılan çalışmalarda Asya kökenli genotipe uygun *H. pylori* kökenlerinin gösterilmesi, bu bakterinin mide mukozasındaki kolonizasyonunun, Bering Boğazı'ndan ilk göçlerle ilişkili olmak üzere, yaklaşık 11-13.000 yıllık bir geçmişe dayandığını göstermiştir(2).

*H. pylori*, insandan insana oral-oral veya fekal-oral yolla bulaşmakta ve *H. pylori* enfeksiyonlarında, düşük sosyo-ekonomik şartlar, kalabalık aile ortamı, sanitasyon yetersizliği, anne-babanın bu bakteri ile enfekte olması gibi ailesel faktörler etkili olmaktadır(3,4,5,23,24). *H. pylori* enfeksiyonu sıklıkla çocukluk döneminde

anneden bebeğe bulaş yolu ile kazanılmaktadır. Çocuklar arasındaki enfeksiyon sıklığı, özellikle diğer aile bireyleri enfeksiyonuna bağlı olmakta ve *H. pylori* enfeksiyonu enfekte annelerin çocuklarında, enfekte olmayanlara göre beş kat daha fazla görülebilmektedir. Çocukluk döneminde birden fazla köken midede kolonize olabilmektedir, ancak kökenlerin çoğu spontan olarak eradike olurken, mide mukozasına ve konağın immün sistemine direnç gösterebilen genotip konakta kalıcı kolonizasyon oluşturmaktadır(2).

*H. pylori*'nin özellikle dişeti ve diş taşlarındaki inatçı kolonizasyonu ve dormant formları insanlar arasında oral-oral geçiş, ayrıca endojen enfeksiyon ve reaktivasyona sebep olmaktadır. *H. pylori* ile enfekte hastalarda kullanılan ve yeterli dezenfeksiyon yapılmamış kontamine endoskoplar ile insandan insana dolaylı yollarla bulaşabilmektedir. Ayrıca dışkı ile kontamine sular ve kontamine gıdalar fekal-oral bulaşda rol alabilmektedir(2).

Bugün dünya nüfusunun yaklaşık yarısının *H. pylori* ile enfekte olduğu kabul edilmektedir. *H. pylori*'nin mide mukozasındaki prevalansı ve insidansı gelişmişlik oranlarına ve yaşa göre ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir(3,25). Gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde % 60–85 arasında değişen prevalans oranı, gelişmiş ülkelerde kişisel hijyene verilen önem ve yapılan başarılı eradikasyon çalışmaları ile % 10-30'lara kadar gerilemiştir. Gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon çocukluk çağında hızla kazanılmaktadır ve adölesan çağa gelmeden toplumun büyük bir kısmı enfekte olmaktadır(2). Gelişmiş ülkelerde çocukluk çağındakilerin % 0-5'i, 20 yaş civarındakilerin % 10-20'si, yetişkinlerin ise % 30-50'sinin bu bakteri ile enfekteyken, prevalans ile bakterinin alındığı çocukluk dönemindeki sosyo-ekonomik koşullar arasında kesin bir ilişki vardır (25). Özellikle İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra batı toplumlarındaki sosyo-ekonomik gelişmeye bağlı olarak *H. pylori* görülme sıklığı giderek azalmış, bu azalma peptik ülser ve mide karsinomlarında da izlenmiştir. Ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde ise sosyo-ekonomik koşulların yetersizliği ve sağlıklı yaşam koşullarının sağlanamaması nedeniyle prevalans 5-10 yaş arasında % 60-70, yetişkinlerde ise % 85-90'dır(25, 26).

*H. pylori* mide kolonizasyonu olan bireylerin çoğunluğu asemptomatik gastrit şeklinde enfeksiyonu geçirirler de, taşıyıcıların % 20'sinde 10 yıl içerisinde semptomatik bir hastalık gelişebilmektedir ve eğer bakteri eradike edilmezse hastaların % 2-4'ünde 10 yıl içerisinde klinik tablo mide kanserine dönüşebilmektedir(2).

### 2.3. Sınıflandırma

*Helicobacter* türleri insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde yaygın olarak görülen mikroaerofilik, spiral şekilli, Gram negatif mikroorganizmalardır. Doğada, kontamine su kaynaklarında da görülen bu mikroorganizmaların bir çok türü tesbit edilmiştir(5,27). *H. pylori*, taksonomik olarak *Helicobacteraceae* ailesi, *Helicobacter* genusu içerisinde sınıflandırılmıştır(2).

*Helicobacter* genusu içerisinde yer alan türler; doku tropizmi göstermektedir ve bu dikkate alınarak mide (gastrik) türleri ve karaciğer/barsak (enterohepatik) türleri olarak iki grup olarak sınıflandırılmışlardır(Tablo 2-1)(2).

**Tablo 2-1: Helicobacter türleri ve konak tropizmi(2)**

Tür	Konak	Doku	İlk bildirim
<i>H.pylori</i>	İnsan	Mide	1985
<i>H.mustelue</i>	İnsan	GİS	1988
<i>H.cinaedi</i>	İnsan	GİS	1988
<i>H. felis</i>	Kedi	GİS	1991
<i>H.fennelliae</i>	Kedi	GİS	1991
<i>H.nemestrane</i>	M.nemestrina	GİS	1991
<i>H. maridarum</i>	Rodent	GİS	1992
<i>H.acinonychis</i>	Domuz	GİS	1993
<i>H. bilisimbret</i>	Fare	GİS	1993
<i>H.hepaticus</i>	Fare	Karaciger	1994
<i>H.pametensis</i>	Kus, domuz	GİS	1994
<i>H.pullorum</i>	İnsan	GİS	1995
<i>H.bizzozeronii</i>	Köpek	GİS	1996
<i>H.trogontum</i>	Rat	GİS	1996
<i>H.cholecystus</i>	Hamster	GİS	1997
<i>H.rodentium</i>	Laboratuvar faresi	GİS	1997
<i>H.rappini</i>	Fare	GİS	1997
<i>H.salomonis</i>	Köpek	GİS	1997

Doğada kedi, köpek, domuz ve kemiriciler gibi birçok farklı hayvan türünde farklı *Helicobacter* türü tanımlanmıştır ve insanların gastrik mukozasına en iyi uyum sağlamış olan *H. pylori* dışında en sık görülen *Helicobacter* türü MALT lenfoma ile ilişkili olabileceği ileri sürülen *H. heilmannii* (*Gastrospirillum hominis*)'dir. Bunun dışında ishalleri, enflamatuar barsak hastalığı olanlar ve bakteriyemik hastalarda daha az sıklıkta *H.salomonis*, *H.canis*, *H.pullorum*, *H.cinaedi*, *H.fennelliae*, *H.canadensis*, *H.winghamensis*, *H.westmeadi*, *H. felis* ve *H.rappini* gibi enterohepatik *Helicobacter* türleri de insanlardan izole edilmiştir(2,5).

## 2.4. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

### 2.4.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

*H. pylori* S, virgül, martı veya spiraller şeklinde görülen, hareketli, kapsülsüz ve sporsuz mikroaerofilik bir bakteridir. 2,5-3,5 µm uzunluğunda, 0,5-1,0 µm genişliğinde, bir uçta bulunan 1-6 adet arasında değişen sayıdaki kılıflı flajellaları ile son derece hareketli Gram negatif çomaklardır. Dokuda oksintik kanalların içerisinde, epitel hücre yüzeyinde ve lümende görülen *H. pylori* mukus ve dokudan hazırlanan preparatlarda, daha karakteristik olarak balık sürüleri halinde nispeten daha uzun ve kıvrımlı görünümdeyken, besiyerinde üretilmiş kolonilerden hazırlanan preparatlarda spiral formlar daha nadir olup, sıklıkla kıvrımları nispeten kaybolmuş ince çomaklar şeklinde görülmektedir. Antibiyotik kullanımı sonrası, dezenfektanlar veya aşırı oksijenlenme gibi olumsuz şartlara maruz kalmış gastrik doku örneklerinden hazırlanan preparatlarda ise düzensiz çubuklar veya yuvarlak, kokoid şekillerde görülmektedir. “Dormand form” olarak tanımlanan kokoid bakteriler canlı ve metabolik yönden aktif oldukları halde in-vivo şartlarda üretilmemektedir. Bu formlar tedavi başarısızlıklarından sonraki reaktivasyonlardan sorumludur. Elektron mikroskobu ile yapılan ultrastrüktürel çalışmalarda kokoid formlarda U şeklinde kıvrılmış basilin uç kısımlarının membrana ait bir uzantı ile bağlanmış olduğu gösterilmiştir(2,6,23).

*H. pylori*'nin özgün morfolojisi, ışık mikroskobu ile başarılı bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Gerek dokudan hazırlanmış kesit veya yaymalar, gerekse besiyerindeki kolonilerden hazırlanan preparatlar, Gram boyası ile boyanabilecekleri gibi, karşıt boya olarak karbol fuksinin kullanıldığı Gram boyası, Giemsa, sadece sulu fuksin veya iyi süzölmüş karbol fuksinle 1-2 dakika muamele edilerek boyanabilmektedir. Ayrıca Hematoksilen-Eozin, Modifiye Giemsa, Warthin-Starry gümüş boyası ve Akridin oranj gibi çeşitli histolojik boyalarla da boyanabilmektedir (28,29).

### 2.4.2. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikler

*H. pylori*'nin hücre duvarı; ince bir peptidoglikan tabaka ve hücreye somatik antijenik özellik veren lipopolisakkaritten oluşan yarı geçirgen dış membran ve iç

membrandan oluşan tipik Gram negatif bakteri hücre duvarı özelliği taşımaktadır(2,6,23).

*H. pylori*'nin hücre duvarı, *Campylobacter*'lerden farklı ve ayırıcı nitelikteki protein ve yağ asitlerinin kompozisyonu içermektedir. Hücre duvarında; yüksek oranda tertradekanoik asit (14:0) ve 19 karbonsiklopropen (19:0 cyc) gibi uzun zincirli yağ asitleri yer almaktadır. Yapıda daha düşük oranlarda da hegzadekanoik (16:0), oktadekanoik (18:0) ve linoleic (18:2) asit yer almaktadır(6). Hücre duvarı yapısında fosfatidil etanolamin (% 79,1), lizofosfatdiletaolamin (% 16) ve fosfatidil kolin (% 1,9) gibi polar başlı nötral fosfolipitlerin yanı sıra fosfatidik asit (% 52,7) ve fosfatidilserin (% 47,3) gibi asidik fosfolipitler bulunmaktadır. *Campylobacter*'lerin hücre duvarında görülen metilli menakuinonlar *H. pylori*'de yoktur. Stoplazmik membranda bulunan kolesterol glukozit *Helicobacter* türleri için spesifiktir(6).

#### 2.4.2.1. Lipopolisakkarit (LPS)

*H. pylori* kökenlerindeki LPS, özellikle 3-hidroksi yağ asitlerinin yapısı ile diğer enterik bakterilerin LPS'lerinden yapısal ve antijenik olarak farklılıklar göstermektedir. *H. pylori* LPS'inde O-spesifik karbon zincirlerinde dal sayısı 6'dan 5'e düşmüştür, buna karşılık, zincirlerdeki karbon sayısı artmıştır. Bu yapısal değişim LPS'in biyolojik aktivite ve antijenik özelliğini *E. coli* ve *Salmonella*'ların LPS'inden 1000 kat daha düşürerek bakterinin immün sistemden kaçışını, dolayısıyla bakterinin gastrik mukozada uzun süreli kolonizasyonunu ve gastrik mikroçevreye adaptasyonunu sağlamaktadır(2).

*H. pylori*'nin glikolipidlerinin çoğu kısmen fukozillenmiş, glikozillenmiş veya galaktozillenmiş N-acetyllactosamine O-polisakkarid yan zincirler bulunmaktadır ve bunlar insanlardaki normal hücre yüzey glikolipidler/konjugatları olan Lewis a, Lewis b H1 antijenleri ile homoloji gösteren Lewis x ve/veya Lewis y antijenlerini oluşturmaktadırlar. Bu benzerlik de bakteriyi konağın immün cevabına karşı korumakta ve gastrik mukozada uzun süreli kalışını sağlamaktadır veya otoimmün cevaba yol açarak patolojik olayları başlatabilmektedir(2,6,22).

### 2.4.2.2. Lipid A

*H. pylori* kökenlerinde birçok bakteriden farklı olarak Lipid A'nın yapısında 3-hidroksidekanoik asit yer almazken, buna karşılık alışılmışın dışında biyolojik yönden daha düşük aktiviteye sahip fosforillenmiş yağ asitleri görülmektedir. Bunlar genel anlamda LPS'nin düşük biyolojik aktivitesinden ve kronik kolonizasyonundan sorumludur(6,30). Bu düşük biyolojik aktivite *H. pylori* LPS'lerinin *E.coli* LPS'lerine göre lipit bağlayıcı proteinlere ve CD14'lere daha zayıf bağlanmasına neden olmaktadır(6,22).

### 2.4.2.3. Dış Membran Proteinleri

*H. pylori* hücre duvarında, mukozal immün cevabı uyarak gastroduodenal patolojide önemli olan, ayrıca gastrik mukozaya bağlanma ve gastrik mikroçevreye uyumu sağlayan çok sayıda protein bulunmaktadır(6,22,31).

Porinler, *H. pylori*'nin özellikleri en iyi tanımlanmış ve dış zarına yerleşmiş proteinleridir. *H. pylori* kökenlerinde şimdiye kadar fonksiyonel olarak en iyi karakterize edilmiş 5 porin proteini, moleküler ağırlıkları 29 ve 75 kDa arasında olan içleri su dolu non-spesifik kanallardır ve Hop A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmiştir. Bu kanallar hidrofilik moleküllerin, besinlerin ve bazı antibiyotiklerin dış zardan pasif geçişine izin vermektedir. Hop protein ailesinin bir üyesi olan BabA (HopS) da Lewis b'ye bağlanmada bir adhezin olarak görev almaktadır ve önemli bir virülans faktörüdür(6,22).

*H. pylori* yüzeyinde eksprese edilen ısı şok proteinleri (Hsp - Heat Shock Proteins) büyük moleküler ağırlığa sahip şeparon proteinlerdir. Bu proteinler insanlardaki birçok hücre Hsp'leri ile homolog olmaları nedeni ile konak immün sistemi tarafından algılanmamaktadırlar. Ancak, kronik enfeksiyonlarda konak immün sistemi tarafından algılanırlar ve böylece patolojik otoimmün cevap ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, gastrik karsinomalara kadar giden irreversibl doku hasarı tetiklenmektedir(32,33).

#### 2.4.2.4. Flajella

*H. pylori*'nin sayıları 1–6 arasında değişen polar flajellaları, mikroorganizmanın mide içerisinde yaşaması ve hastalık oluşturması için mukus içerisinde hızlı harekete uygun şekilde düzenlenmiştir. Birçok flajellalı bakterinin hızı, ortamın vizikozitesi su vizikozitesine eşit iken, en yüksek düzeydedir ve viskozitenin 2–3 centipoise çıkması halinde hız süratle düşmektedir. *E. coli* gibi hızlı hareket eden bakteriler 20 centripois'e kadar hareketlerini sürdürebilirken, *H. pylori* 200 centripois de hareketliliğini korumaktadır ve bu yoğunlukta pH>4 iken hızı 60-70 µm/saniye civarındadır. *H. pylori* flajelası, Gram negatif bakterilerde olduğu gibi, sitoplazmik membrandaki FliF, FliM ve FliS protein polimerlerinden oluşan bazal cisimcikten çıkmaktadır, dış membrana gömülü olan diski geçtikten sonra FlaE protein polimerinden oluşan, hücre duvarına bağlı dirsekten geçerek hücre dışına salınmaktadır. Flajella; FlaA ve FlaB, protein iplikçiklerinden oluşan, yaklaşık 30 µm uzunluğunda, 2,5 nm kalınlığında ve uçları topaç görünümlü şişkinlikle sonlanan ve bunu devam eden dış membranın çevrelediği sarmal yapıda kamçıdır. Flajellar kılıf, epitoplara immün sistemden maskelenmesinde ve asidik direncin sağlanmasında rol oynamaktadır(2,6).

#### 2.4.3. Genomik Özellikler

*H. pylori*'nin 26695 nolu kökeninin ilk olarak 1997 yılında, tam genom dizi analizinin bildirilmiş, bunu takiben *H. pylori* J99 kökeninin tam genom dizi analizi tamamlanmıştır. Bu kökenlerin gen büyüklükleri; 26695 nolu köken 1 667 867 ve J99 kökeni 1 643 831 bp'dir. *H. pylori* 26695 genomunda, genomun % 91'ini oluşturan 1590 açık okuma bölgesi, *H. pylori* j99 genomunda ise genomun % 90,8'ini oluşturan 1495 açık okuma bölgesi (ORF-open reading frame) bulunmaktadır(2,6).

Genlerin 300 den fazlası membran yapısı ile ilişkilidir ve ayrıca beta-galaktosidaz hariç glukoz metabolizması ile ilişkili genler, enerji sentezinde rol alan oksidaz, sitokrom oksidaz ve katalaz gibi oksidasyon redüksiyon genleri, çok sayıda taşıyıcı sistem, iki bileşenli regülatör sistem ve ureA, ureB, ureE, ureF, ureG, ureH ve ureI gibi üreaz genleri gibi fonksiyonel gen bölgeleri tanımlanmıştır. *H. pylori*'nin midenin asidik ortamına karşı direncinde ve patogeneizde önemli rol oynayan üreaz enzimi ile ilişkili proteinler, bakterinin bütün proteinlerinin % 2-15'ini oluşturmaktadır(2).



Genomda G+C oranı ortalama % 39'dur. Düşük G+C oranı genetik plastisite ve sık görülen rekombinasyonların sebebidir. *H. pylori* 26695 kökeninde 5 bölgede, *H. pylori* J99 kökeninde ise 9 bölgede düşük G+C oranına (% 33-35) sahip yabancı gen dizileri, yani Patojenite adaları gösterilmiştir. *H. pylori* 26695 kökenindeki 40 kb uzunluğundaki R2 bölgesi cagPAI bölgesi olup, virulansla ile direkt ilişkili 31 farklı geni kodlamaktadır. Diğer 4 bölge, RNA polimerazın  $\beta$  ve  $\beta'$  subunitlerini, kodlayan fusA genini ve restriksiyon modifikasyon sistemleri ile ilişkili genleri içermektedir. Genomunda en az iki kopya halinde 16S ve 23S rRNA genleri bulunmaktadır(2).

Ayrıca genomda, % 2–8 oranında görülen sinonim ve non-sinonim mutasyonlar mikroorganizmanın konağa ve mide şartlarına uyumunu kolaylaştırmaktadır. Fakat, bakterinin mide dışındaki çevre şartlarına karşı duyarlılığı *E. coli* genomundakinden 10 kat daha düşük sayıdaki regülatör bölgelerle izah edilmektedir. *H. pylori* kökenlerinin % 40'ında büyüklükleri 1,5 kb ile 23,3 kb arasında değişen plazmidler bulunmaktadır, ancak virulansla ilişkili herhangi bir gen içermemektedirler(2).

#### 2.4.4. Biyokimyasal Özellikler

*H. pylori*, zorunlu mikroaerofilik bir bakteri olup, ancak % 5-10 CO<sub>2</sub> ve % 5-20 oksijen varlığında üreyebilen ve süperoksit dismutaz, peroksidaz, sitokrom oksidaz, katalaz ve güçlü üreaz enzimlerine sahiptir. Ayrıca *Helicobacter*'lerin tanımında nitratları nitrite indirgemeleri, alkalen fosfataz, indoksil asetat hidrolasilaz, gama-glutamil transpeptidaz aktiviteleri, 42 °C'de üreme, nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılık özellikleri ayırtedici özelliklerdir. *H. pylori* alkalen fosfataz aktivitesine sahiptir, nitratları redükte edemez, sülfürlü bileşikleri kullanarak H<sub>2</sub>S oluşturabilir, hippuratu hidrolize edemez, nalidiksik aside dirençli ve sefalotine duyarlıdır. DNaz, lösin aminopeptidaz,  $\gamma$ -glutamilaminopeptidaz enzimlerini üretmektedir ve yaşaması için gereken enerjiyi aminoasit, üre ve karbondioksitten sağlamaktadır(2,5,6,23).

#### 2.4.5. Üreme ve Kültür Özellikleri

Mikroaerofilik bir mikroorganizma olan *H. pylori*, % 5 oksijen ve % 5-10 karbondioksitli ortamda, optimum üreme sıcaklığı 37 °C olup, asidik ortamda üremesine karşın nötrofilik bir bakteridir. Optimum pH 6,8-7,6 arasında üreyebilmekle beraber pH

4,1'in altında üreyememekte, ancak çevre şartları ve ortamdaki metabolitlere bağlı olarak pH 2,5-9 aralığında canlılığını koruyabilmektedir. Çevrenin pH'ı 7,0 iken bakteri sitoplazmasının pH'ı 8,4 olması, aynı pH değerinde sitoplazma pH'ı 7,8 olan *E.coli*'ye göre *H. pylori*'nin asit pH'a diğer enterik bakterilerden daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Güçlü üreaz aktivitesi ve hücre membranında kısa sürede adaptif değişiklikler yapabilmesine bağlı olarak asidik ortamda midede özellikle asit sekrete eden ve pH 1-1,5'e kadar düşen parietal hücrelerin yer aldığı oksintik kanalların içerisinde üremektedir(2,6,23).

*H. pylori*; tanısında kültür, altın standart olmasına karşın in vitro şartlarda optimize besiyerlerinde bile son derece yavaş üreyen, adi besiyerlerinde üretilemeyen bir mikroorganizmadır. % 5 O<sub>2</sub>, % 75 N<sub>2</sub> (nitrojen), % 10 H<sub>2</sub> (hidrojen) ve % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren nemli atmosferde (% 98), % 7-10 oranında at kanı, % 1 izovitaleks, % 0,25 maya ekstraktı içeren Brucella agar, Beyin Kalp İnfüzyon agar, Colombia agar gibi modifiye zenginleştirilmiş besiyerlerinde 37 °C'de 3-7 günlük inkübasyon sonunda 1-2 mm büyüklüğünde yuvarlak, şeffaf su damlası şeklinde koloniler oluşturmaktadır(Şekil 2-1). Ayrıca besiyerlerine hemin, serum, nişasta, kömür ilavesi üremeyi artırabilmektedir ve miks floralı veya kontamine örneklerde diğer mikroorganizmaların üremesini baskılamak için vankomisin, trimetoprim, kanamisin, polimiksin B, sefoperazon ve amfoterisin-B gibi antibakteriyel ve antimikotikler ile aktif karbon ilavesi *H. pylori*'nin üreme şansını arttırmaktadır(2,4,6,23).



**Şekil 2-1: *H. pylori* kolonilerinin görünümü(34)**

*H. pylori* için kültür yapılırken hastadan alınan biyopsi materyali mümkünse birden fazla alandan ve lezyonun kenarından alınmalı, mümkünse besiyerlerine hasta

başında ekim yapılmalıdır. Ekim hemen yapılamıyorsa biyopsi örneği içerisine % 3 oranında gliserin, vankomisin, trimetoprim, kolistin, polimiksin B, nalidiksik sikloheksimid, nistatin veya amfoterisin B ilaveli Brucella broth, Nutrient broth veya Beyin Kalp İnfüzyon broth gibi sıvı besiyerleri içerisinde, soğukta taşınarak en geç 2 saat içerisinde kültür için uygun besiyerlerine ekilmelidir. Uygun atmosfer ve ısı şartlarında inkübe edilen besiyerleri kültürün 3. 5. ve 7. günlerde kontrol edilmeli ve 7 günlük inkübasyon süresi mutlaka beklenmelidir. İnkübasyon sırasında besiyerlerindeki şüpheli kolonilerden; Gram boyama, oksidaz, katalaz ve üreaz deneyleri ile identifikasyon yapılmalıdır(2,5,28,29).

*H. pylori* in vitro şartlarda 3-4 pasajdan sonra canlılığını kaybedebilmektedir. Üretilen kökenler % 0,25 maya ekstraktı, % 10 at kanı ve % 15 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon broth'da  $-70^{\circ}\text{C}$  de aylarca saklanabilmektedir(2).

## 2.5. Patogenez

*H. pylori* enfeksiyonlarında kolonizasyon sonrasında oluşan kronik aktif gastrit tüm *H. pylori* taşıyan olgularda görülebilmektedir, fakat intragastrik dağılım ve kronik enflamatuvar sürecin şiddeti; kolonize olan kökene, konağın genetik yapısı ve bağışıklık yanıtı, diyet ve asit düzeyi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. *H. pylori*'nin neden olduğu ülser, mide kanseri ve lenfoma bu şiddetli kronik enflamasyon sürecinin sonucudur ve *H. pylori*'nin patogenezinde bazı genlerin ekspresyonu, enfeksiyon kaynaklı hücre proliferasyonu, epitelyal hücre uzaması ve polarite kaybı, hücre-hücre kavşağa bozulması ve azalmış mide asit salgısı gibi hem mikroorganizmaya ait çok sayıdaki virülans faktörün, hem de konak ve çevreye ait faktörlerin etkili olduğu birçok mekanizma birlikte rol almaktadır(6,23,35,36,37).

Bakteriye ait virülans faktörler arasında; mukus içerisinde hareketi sağlayan spiral şekil ve flajella, gastrik hücrelere bağlanmayı kolaylaştıran hücre duvarı protein yapıları ve lipopolisakkaritler (LPS), midede asit ortama uyumu sağlayan üreaz, mukus tabakasını incelten musinaz, katalaz, sitokrom oksidaz, fosfolipaz A2 ve C gibi proteazlar, demir bağlayan proteinler, konak hücre ile antijenik benzerlik gösteren Hsp ve Lewis antijenleri, vacA geni ve cagPAI gibi birçok elemanın bulunduğu faktörler yer almaktadır(2,6,21,23,35,36,37).

### 2.5.1. Kolonizasyon Faktörleri

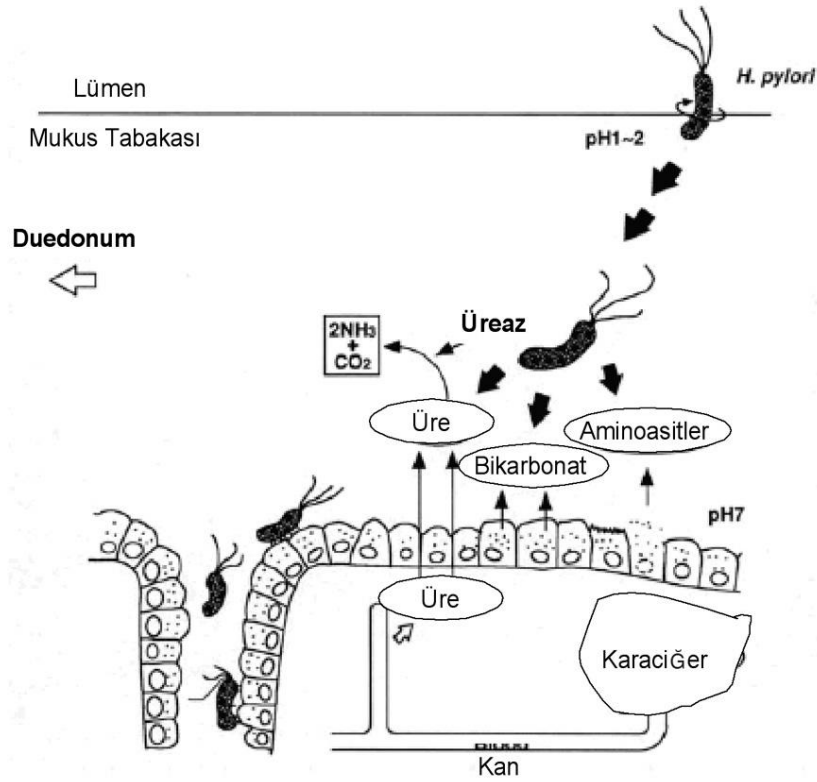
*H. pylori*; bağırsak veya skuamöz tip epitele değilde spesifik olarak midede veya duodenumda gastrik mukozal tabakaya bağlanmaktadır. *H. pylori*'nin midede kolonizasyonunda major rol oynayan flajella, üreaz enzimi ve hücre yüzeyindeki protein yapıda çeşitli adhezinleri sayesinde asidik ortama ve kalın musin tabakasına karşın midenin antrum ve korpus bölgeleri ile duodenumda kolonize olmaktadır(27,35).

#### 2.5.1.1. Hareket ve Flajella

*H. pylori*'nin en önemli virulans faktörü olan hareket yeteneği ve flajella, ayrıca spiral şekil sayesinde sayesinde midede lümendeki asidik ortamdan nötr ortam olan mukus tabakasına hızlı bir şekilde geçmektedir. Ayrıca koruyucu mukus tabakasına ilerlemede üreaz enzimi ile bakterinin etrafında yeterli miktarda bikarbonat ve amonyak katmanı oluşturmasının rolü vardır. Hareket ve üreaz aktivitesinin kolonizasyonda zorunlu bir faktör olduğu hayvan modeli çalışmalarda gösterilmiştir(6,23,38). Flajellanın bağlanması zorunlu olan flajellar çengel proteinini kodlayan flgE geninde oluşan mutasyonlarda flajellin sentezine devam edilmesine karşın hareketsiz ve flajellasız bakteriler oluşmaktadır(6,39).

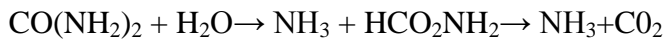
#### 2.5.1.2. Üreaz Enzimi ve Asit Ortama Direnç

*H. pylori*'nin en önemli özelliklerinden biri asidofilik bir bakteri olmadığı halde asidik mide ortamında kolonize olabilmesidir. Arasına olan asidik şoklar dışında midede pH ortalama 4-6,5 arasındadır. *H. pylori*'nin, bu ani asit şoklardan korunması için belli mekanizmalar ve üremek için yaklaşık pH 5,5 olması gerekir. *H. pylori*'nin mideye girmesiyle birlikte, mide ortamında mevcut olan üre ve bikarbonat gradyanlarını kullanarak kemotaktik motilite ile gastrik mukus tabakaya doğru hızla hareket etmektedir(Şekil 2-2). *H. pylori*, asidik gastrik lümende motilitesini kaybetmeden nötral pH'a doğru hızla hareket etmesi gerekmektedir. Üreaz enzimi, *H. pylori*'nin mide asidine karşın hayatta kalması ve üreyebilmesi için gerekli olan en önemli enzimidir. Üreaz aktivitesi kökenler arasında farklı seviyelerde olmakla birlikte tüm *H. pylori* kökenlerinde mevcuttur ve üreyebilme özelliklerine bağlıdır(1,6).



**Şekil 2-2: *H. pylori*'nin gastrik mukozaya kolonizasyon modeli(9)**

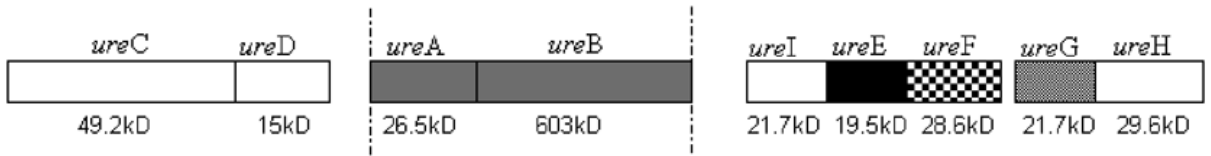
Üreaz enzimi 2 şekilde asidik ortamı alkali ortama çevirebilmektedir; nitrojen metabolizmasında kullanılan argininaz enzimi ile L-arginin'i, L-ornitin ve üreye çevirerek metabolik olarak proteinlerden üretilen üreyi hidrolize ederek, yada doku aralıklarından sızan ve mide sıvısındaki konsantrasyonu kan düzeyinde, yani 1-3 mM olan, üre ve bikarbonatı, amonyak ve karbamat (karbamik asit)'a hidrolize ederek ortamı alkalize etmektedir(Şekil 2.3)(2).



**Şekil 2-3: *H. pylori* üreaz aktivitesi(2)**

Yaklaşık 564 kDa ağırlığında suda çözünür bir metalloproteaz olan üreaz enziminin aktivitesi için, esansiyel iyon olarak  $\text{Ni}^{+2}$ 'e ihtiyacı vardır. 66 kDa ve 29.5 kDa ağırlığında UreA ve UreB olarak tanımlanan iki fonksiyonel alt üniteden oluşan üreaz enzimi; ureC ve ureD olarak iki regülatör alt ünite ve ureA, ureB, ureI, ureE, ureF, ureG ve ureH olarak tanımlanan 7 genden oluşan gen topluluğu tarafından

kodlanmaktadır(Şekil2-4) (2,5). İmmuno-elektron mikroskobik lokalizasyon çalışmalarında üreaz enziminin bakterinin stoplazmasında, periplazmasında ve yüzeyinde bulunduğu gösterilmiştir(5). Üreaz enziminin küçük parçası stoplazma içinde yerleşirken, büyük parçası hücre duvarının en dış katmanında, lipopolisakkarid'e bağlı olarak yerleşmektedir(2). Başlangıçta yüzeydeki üreazın asit ortamdan korunmada anahtar rolü olduğu düşünülürken, enzimin asit ortamda inhibe olduğu gösterilmiştir(5). pH 7-8 aralığında optimum seviyede üretilen yüzeydeki üreaz veya serbest üreazın üretimi ve aktivitesi  $pH \leq 4$  olduğunda tamamen durmaktadır(2). Fakat pH 6.5 iken eser miktarda üretilen internal veya sitoplazmik üreaz,  $pH < 2.5$  olduğunda 15 kat artmaktadır. Dolayısıyla *H. pylori*'nin midede asit ortama adaptasyonunda hücre dışı üreazdan çok, asidik ortamda aktive olan sitoplazmik üreaz rol oynamaktadır. Apoenzim olan UreA ve UreB'nin aktivitesi için gerekli olan  $Ni^{+2}$ 'in bağlanması ve enzim sentezinin düzenlenmesinde üreaz ile ilişkili gen kümesindeki ureI hariç ureE, ureF, ureG ve ureH rol almaktadır. ureI ise; ortamın pH'ına bağlı olarak dış membrana üreaz enziminin transportunu düzenlemektedir(2,5).



**Şekil 2-4: *H. pylori*' nin üreaz enzimi operonu(9)**

*H. pylori*'nin, üreaz negatif mutant ve üreaz inhibitörleri ile yapılan çeşitli hayvan modelli çalışmalarda üreaz enziminin gastrik mukozal kolonizasyonu sağlamada zorunlu role sahip adaptif bir enzim olduğu belirlenmiştir(6). Üreaz enzimi sayesinde ürenin, amonyak ve karbondioksit'e dönüştürülmesiyle, bakterinin etrafında onu çevreleyen ve asidi nötralize eden alkali bir tabaka oluşmaktadır ve böylece üreaz enzimi asit pH'dan korunmaya yardımcı olmaktadır(5,6). Ayrıca üreaz enzimi, kronik *H. pylori* enfeksiyonunun bir özelliği olan lamina proprianın enflamasyonuna neden olan önemli bir virülans faktördür(6). Ayrıca in-vivo üreaz aktivitesinin insan gastrik epitel hücreleri üzerinde toksik etkisi vardır(6,40,41). *H. pylori*'nin mide mukozası yüzeyinde yarattığı pH değişikliğine bağlı olarak mide bezlerinden sekrete edilen  $H^+$  iyonlarının mide lümenine geçişini engelleyerek diffüzyon yolu ile mukozaya geri alınımına yol açmaktadır. Üreaz aktivitesi sonucu açığa çıkan  $NH_3$  mide mukozaya hücreleri arasındaki

sıkı bağları ve bağ kompleksini kopararak mukoza bütünlüğünün bozulmasına sebep olmaktadır. Üreaz enzimi, sekretuar immünglobülinlerin sülfidril bağlarını kopararak antikorların opsonizasyonunu engellemekte ve bakteriyi korumaktadır(2).

### 2.5.1.3. Adezinler ve Dış Membran proteinleri

*H. pylori*'nin spesifik olarak konak hücre makromoleküler reseptörlerine bağlanması; gastrik lümenin hareketine karşı mukozal kolonizasyon ve hasar görmüş gastrik epitelde doku aralıklarından sızan besin maddelerini kullanabilmesi için gereklidir(6).

*H. pylori*'nin en iyi tanımlanmış adhezin-reseptör ilişkisi, seçici olarak gastrointestinal mukozada yer alan fukozillenmiş Lewis b kan grubu antijenlerine bağlanan, babA geni tarafından kodlanan ve bir dış membran protein olan BabA proteindir(1,6). Hayvan deneyleri BapA aracılı adezyonunun *H. pylori*'nin kolonizasyonu ve patogenezi ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür(1,42,43). BabA tarafından Lewis b antijenlerinin tanınması, bu bölgeye özgü kolonizasyonda anahtar rol oynamaktadır. Hop protein ailesinin bir başka üyesi olan 34-kDa'luk OipA proteini yine bir adezin olarak rol alabilmektedir, ancak proenflamatuar yanıtı indükleyici bir protein olarak tespit edilmiştir(1,44).

*H. pylori* kökenlerinin çoğu immünolojik olarak insan kan grubu antijenleri ile yakından ilişkili ve yapısal olarak fukozillenmiş oligosakkarit antijenler olan LPS'leri içermektedirler(1). *H. pylori*'nin hücre zarında bulunan bu LPS'ler, özellikle tip 2 kan grubu determinantları olan Lewis x ve Lewis y gibi konak kan grubu antijenlerine benzeyen O polisakkarit zinciri içermektedir(6). Bu bakteriyel antijenler (Lewis antijenleri), antijenik varyasyon göstermektedir ve immün yanıtta katkıda bulunmaktadır(1). Bu antijenlerin bakteriyel ekspresyonu, gastrik epitel hücrelerinde eksprese edilen Lewis antijenlerini taklit yeteneği ile bakterinin immün sistemden kaçabilmesini ve kolonizasyonunu sağlamaktadır(5,6) Başlangıçta, Lewis antijenlerinin hücre adezyonunda rolü olduğu düşünülmekteyken, fakat yeni veriler adezyonda ve kolonizasyonda sadece sınırlı bir rolü olduğunu göstermiştir(1,45,46). Lewis antijenlerinin ekspresyonu epitel hücreleri tarafından bakteriyel internalizasyonunu arttırmaktadır ve bunun potansiyel olarak doğal immün yanıtı etkilediği düşünülmektedir. *H. pylori*'nin LPS'leri CagA'dan bağımsız şekilde epitel

hücrelerinden ve bağışıklık hücrelerinden NF- $\kappa$ B ve IL-8 üretimini uyarmaktadır. Ayrıca lipopolisakkaritin özellikle lipid-A komponenti; sitokin sekresyonunu uyarmaktadır ve endotoksik etkilerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Diğer Gram negatif bakterilerle karşılaştırıldığında *H. pylori*'nin LPS'leri doğal immün yanıtın zayıf bir aktivatörüdür. Bunun bir sonucu olarak, immün sistemin *H. pylori* ile aktivasyonunda *H. pylori*'nin LPS'leri önemli bir faktör olarak görünmemektedir(1). LPS'ler tarafından taşınan Lewis antijenik determinantların faz varyasyonlarının konak kan grubu antijenlerini taklit yeteneğinin gastrik otoimmüniteyi ya da LPS'in immün-stimülator etkisini hafifletip hafifletmediği açık değildir. Self-epitoplara benzer Lewis antijenlerinin bakteriyel ekspresyonu, moleküler taklit ile muhtemelen immün sistemden kaçışa ve bakteriyel persistansa katkıda bulunmaktadır. Bu taklit yeteneği ile Lewis antijen içeren gastrik proton pompası pariyetal hücreleri gibi hücrelere karşı otoantikor üretiminin artmasına yol açtığı ileri sürülmüştür. Ayrıca LPS midede hücre tabakaları ile etkileşerek mün sintezini inhibe etmektedir ve pepsinojen sekresyonunu uyarır, böylece mukozal bariyerin bozulmasına neden olmaktadır(1,5).

Ayrıca sialil-dimerik Lewis x glikosfingolipid, sialik asit bağlayan adezin (SabA) olarak tanımlanmıştır ve sialik asit içeren glukokonjugatlara bağlanmaya aracılık etmektedir(1,6). *H. pylori* kaynaklı gastrik enflamasyon ve gastrik kanser, non-sialize Lewis antijenlerinin sialize olmuş Lewis x ve sialize olmuş Lewis a antijenleri ile yer değiştirmesi ile ilişkilidir. İnsan granülositleri de yüzeylerinde sialize olmuş karbonhidrat taşımaktadır ve bu hücreler spesifik olarak SabA tarafından tanınmaktadır. *H. pylori*'nin in vitro olarak granülositlere bağlanması sonucu bu hücrelerin non-opsonik aktivasyonuna sebep olmaktadır(1). Kökenlerin sialize glikokonjugatlara bağlanabilme kapasitesi, virulansa ve enfeksiyonun kronikleşmesine katkı sağlamaktadır(6). SabA ekstrasellüler matriks proteini Laminine de bağlanabilmektedir. Böylece konak hücre ile yakın bir ilişki kurulabilmektedir ve bu ilişki bakterinin sadece konağın immün gözetiminden kaçmasına yardım etmemekte, CagA, VacA ve diğer virülans faktörlerin doğrudan doğruya hücreye transferiyle bakterinin immün yanıtı kontrol etmesini sağlamaktadır(1).



### 2.5.2. Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Patogeneizde Rol Alan Diğer Enzimler

*H. pylori*'nin konak savunmasından korunma faktörleri arasında; aynı zamanda kolonizasyon faktörü olan hareket yeteneği ve flajellası, güçlü üreaz enzimi gibi yapıların yanı sıra katalaz ve süperoksit dismutaz enzimi, tioredoksin gibi suda çözünür ekstraselüler mediyatör proteinler ve proliferasyonu inhibe eden proteinler gibi çok sayıda yapısal eleman, enzim ve toksinleri ile lokal veya sistemik, doğal veya kazanılmış immün yanıtta korunmaktadır(2,4,5,6).

*H. pylori*'nin gastrik mukozada canlı kalmasını sağlayan diğer adaptif enzimleri antioksidan defans mekanizmasında rol oynayan katalaz ve süperoksit dismutazdır. Her iki enzim de lamina propria ve epitel hücrelerine infiltre olan aktive nötrofillerden salınan hidrojen peroksit ve reaktif oksijen radikallerinin toksik etkilerinden korumaktadır(6,23).

*H. pylori* sahip olduğu Thioredoxin enzimi ile; proteinlerin disülfid bağlarını keserek, mukus tabakasındaki münleri ve konakta sekrete edilen nonspesifik ve spesifik IgA, IgG ve IgM gibi immunoglobulinleri denatüre ederek vücut savunmasından korunmaktadır(27). Thioredoxin'in bir arginaz şeparonu olduğu ve bakteriyi oksidatif ve nitrosatif strese karşı koruduğu belirlenmiştir(47).

Ayrıca fosfolipitçe zengin olan mukozaya hasar veren fosfolipazların aktivitesi sonucu ortaya çıkan maddelerin ülser oluşturma potansiyelleri bulunmaktadır. Fukosidaz, nöraminidaz ve glikosülfataz enzimleri mukus tabakasının yapısını bozup, bu tabakanın koruyucu etkisini azaltmaktadır. Bakterinin asetaldehit oluşturmada alkol dehidrogenaz enzimi rol oynamaktadır. N-alfa histamin metiltransferaz enzimi, midede N-alfa-metil histamin konsantrasyonunu arttırmaktadır ve bu da mide asit sekresyonunu stimüle etmektedir(23).

### 2.5.3. Patogeneizde Rol Alan Gen Bölgeleri

*H. pylori* *cagPAI*, *vacA*, *babA*, *iceA*, ve *oipA* gibi virulansta çok değişik ve hayati roller oynayan gen bölgelerine sahiptir

#### 2.5.3.1. *cagPAI* (Sitotoksin İlişkili Gen Patojenite Adası) ve *cagA* Geni

*H. pylori* enfeksiyonu sonucunda çoğu hastada belirgin bir komplikasyon görülmemekteyken, bazı hastalarda kronik aktif gastrit gelişebilmektedir(1). Bunun

nedeni bazı kökenlerin diğerlerine göre daha virulan olmasıdır. Bakterinin diferansiyel patojenik özelliklerinin incelendiği ilk çalışmalarda daha virulan olan *H. pylori* kökenlerinin in-vitro hücre kültürlerinde morfolojik değişiklikleri, vakuolizasyonu ve ardışık dejenerasyonu indüklemeye yeteneğinin daha fazla olması ve patojeniteleri arasında korelasyon bulunmuştur(1,48). Bu aktivite immünojenik olan ve cagA geninde kodlanan CagA proteininin varlığı ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir(49).

*H. pylori* kökenlerinin yaklaşık % 50-% 90'ında bulunan, Tip1 köken olarak adlandırılan ve virulans ile güçlü ilişkisi olan sitotoksin kodlayan cagA geninin yer aldığı cagPAI, 40 kDa büyüklüğünde yaklaşık 27-31 gen lokusuna sahip gen bölgesidir(1,6,37,50,51,52). cagPAI taşımayan köken ise Tip II köken olarak tanımlanmakta, daha çok non-ülser dispepsi gibi benign gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalardan izole edilmiştir. cagPAI, bakterinin ortama adaptasyonunda ve Tip-IV sekresyon sisteminde (T4SS) rol alan agresif proteinleri kodlamaktadır(2,37). cagA, virulan kökenlerde bulunan cagPAI için bir marker olarak kabul edilmektedir ve virulan olmayan *H. pylori* kökenlerinde yoktur(53,54). cagA pozitif kökenlerin çoğu, tam ve ardışık cagPAI'e sahiptir(6). Bu nedenle cagPAI taşıyan kökenler CagA<sup>+</sup> kökenleri olarak adlandırılmaktadır ve hastalarda CagA proteinine karşı antikor titreleri tespit edilmektedir(1). *H. pylori*'nin virülans faktörleri arasında cagPAI'nin enflamasyonu indüklediği, ülserasyon ve karsinogenezde rol aldığı gösterilmiştir. cagPAI-pozitif ve cagPAI-negatif *H. pylori* kökenleri karşılaştırıldığında, cagPAI-pozitif kökenlerin enfeksiyonunda şiddetli gastrik mukozal enflamasyon artışı, peptik ülser gelişimi ve mide kanseri için risk artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(55).

cagPAI, cagA geninin kodladığı onkojenik bir potansiyele sahip olan CagA proteini gibi birkaç önemli patolojik fonksiyona sahiptir(55,56) cagPAI aynı zamanda konak hücrenin içine CagA proteini ve peptidoglikan gibi bakteri bileşenlerin aktarılmasını sağlayan moleküler şırınga benzeri bir yapı olan T4SS'ni kodlamaktadır(57,58,59). cagA geninin kodladığı efektör CagA proteini ve peptidoglikan gibi virülans faktörler hücre membranından gastrik hücreye *Agrobacterium tumefaciens*'dekine benzeyen bir T4SS ile transfer edilmektedir.(1,37). cagPAI, T hücrelerinin apoptozu uyarma yeteneğinden dolayı da immün yanıtı etkilemektedir(60,61). Aynı zamanda T4SS yapı ve konak hücre arasındaki etkileşim sonucunda epitel hücrelerinden proenflamatuar sitokinlerin indüksiyonu gerçekleşir(1,62).

Bütün Tip 1 kökenlerde bulunan ve *cagPAI*'nin 3' ucunda yer alan *cagA* geninin kodladığı CagA proteini, 128 kDa büyüklüğünde oldukça immünojenik olan ve inflamatuvar cevabı uyaran bir proteindir(6,37,49,63). *H. pylori* kökenleri *cagA* pozitif kökenler ve *cagA* negatif kökenler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır(64). Japonya, Kore ve Çin gibi Doğu Asya ülkelerinden izole edilen *H. pylori* kökenlerinin %90-95'den fazlası *cagA* geni taşımaktayken, Amerika ve Afrika gibi Batı ülkelerinden izole edilen *H. pylori* kökenlerinin yaklaşık % 60-75'i *cagA* geni taşımaktadır(65,66,67).

CagA+ kökenler, enflamasyon artışı, hücre iskelet değişiklikleri ve farklılaşması, gastrik mukozanın metaplazisi ile de ilişkilidir(37). Doğu Asya ülkelerindeki CagA+ kökenler atrofik gastrit, gastrik kanser gibi gastroduodenal patolojiler için risk faktörüdür. Doğu toplumları kadar olmasa da Batı toplumlarında da CagA+ kökenler ile enfekte hastalarda, genellikle daha fazla inflamatuvar yanıt gelişmesi sonucu ile peptik ülser veya gastrik kanser riski yüksektir(1,68,69).

T4SS ile hücre sitozolüne birkez transfer edilen CagA proteini burada Src kinazlar tarafından fosforile edilmektedir(37,70,71). Src kinazlar, hücrede temel sitoskelatal işlemleri, hücresel proliferasyon ve diferansiyasyonu kontrol eden ve karsinogenezde anahtar rol oynayan enzimlerdir(1,72,73). Src kinazlarla fosforile olmuş CagA ardından hücre sinyal molekülü olan sitoplazmik Src homoloji 2 fosfatazın (SHP-2) Src homoloji 2 (SH2) domainine bağlanmaktadır, hücre sinyal sistemini bozar ve bunun sonucunda epitel hücrelerinde morfolojik değişimle beraber atrofik gastrit ve atrofiden intestinal metaplaziye dönüşüm olabilmektedir(1,37,54,63,74,75,76).

CagA-SHP-2 kompleksi konak hücrenin sinyal transdüksiyon yolu ile etkileşmektedir ve hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozisi manipüle etmektedir(77). Bunun sonucunda, hücre saçılması ve invaziv hücre büyümesi gibi konak hücre iskeletindeki yeni yapılanmalarla gastrik epitel hücrelerinde sinekkuşu fenotip (hummingbird) gelişmektedir(76,78). Bu süreç, sadece *H. pylori* ve konak hücre etkileşiminde önemli bir strateji değil, aynı zamanda *H. pylori*'nin patogenezinin ve karsinogenezinin en önemli mekanizmasıdır(70). Hücre kültürlerinde CagA translokasyonu, enfekte olmuş konak hücrelerin saçılma ve uzama gibi malign hücresel dönüşümüne yol açmaktadır(51).

T4SS ile enjekte edilen bilinen tek efektör protein, herhangi bir bilinen bakteriyel veya ökaryotik protein ile bir dizi bakımından homoloji göstermeyen CagA'dır(70,72). SHP-2, CagA deregülasyonu gastrik epitel hücrelerinin anormal

proliferasyonu ve uzama indüksiyonu sonucu oluşmaktadır ve kronik gastrit ya da mide kanserine yol açan hücre büyümesi ve hücre hareketliliğinde önemli bir rol oynamaktadır(79). CagA'nın SHP-2'ye bağlanma aktivitesi tirozin fosforilasyon bölgelerinin sayısı ile belirlenmektedir. Doğu Asya ülkelerindeki *H. pylori* CagA proteininin SHP-2 bağlama ve hücredeki morfolojik değişiklikleri indüklemeye potansiyeli Batı izolatlarındaki CagA proteinlerinden önemli ölçüde daha yüksektir(80). Batı ve Doğu Asya tip CagA proteinlerinin biyolojik aktiviteleri arasındaki farklar, bu iki coğrafi bölge arasındaki mide kanseri sıklığı açısından dikkat çekici farkı açıklayan neden olabileceği bildirilmiştir(75,80).

cagA geninin 5' ucu oldukça iyi korunmuş iken 3' ucu değişkendir(81). cagA'nın 3'ucu, yapısal olarak glutamin-izolösin-prolin-tirozin-alanin'den oluşan ve EPIYA motifi olarak tanımlanan tekrarlayan beş farklı amino asit dizisinin (Glu-Ile-Pro-Tyr-Ala) varlığı ile karakterizedir(63,70,82). CagA'nın tirozin fosforilasyonu, proteinin karboksi terminal değişken ucundaki tirozin fosforilasyon motifinde gerçekleşmektedir ve fosforilasyon için CagA'nın SHP-2'ye bağlanması gerekmektedir(1). Bu motifler farklı amino asit dizilerine göre EPIYA A, B, C ve D olarak tanımlanmaktadır(81,83).

Coğrafi konuma göre iki tip CagA proteini vardır. Batı tip CagA; Avrupa, Amerika, Avustralya ve Afrika'da yaygın olan EPIYA-A, EPIYA-B ve Batı tip CagA'ya özgü EPIYA-C segmentlerini içermektedir(84,85). Farklı Batı tip CagA proteinleri arasında EPIYA-C segmentlerinin sayısı birden beşe kadar değişmektedir(86,87). Doğu tip CagA ise; Japonya, Kore ve Çin'de yaygın olan EPIYA-A, EPIYA-B, ve Doğu Asya kökenleri için spesifik olan EPIYA-D segmentlerini içermektedir(63,64,66).

Farklı *H. pylori* izolatlarının CagA proteinleri arasında EPIYA motiflerinin sayıları açısından da farklılıklar vardır(1,72). CagA'nın tirozin fosforilasyon miktarı tekrarlayan EPIYA dizilerinin sayıları ile direkt ilişkilidir. Daha çok sayıda EPIYA motifi içeren kökenlerin, epitelyal hücre kültürlerinde yüksek seviyede CagA fosforilasyonu ile morfolojik değişiklikleri daha belirgin indüklediği, dolayısıyla atrofik gastrit ve gastrik kanser riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir(1,88). Özellikle 4'den fazla EPIYA motifi içeren kökenler atrofik gastrit ve gastrik kanser ile korele bulunmuştur. Ayrıca, hücrelerin morfolojik değişiminde önemli bir rol oynayan EPIYA motifinin tirozin fosforilasyonu ile ilişkili olarak Doğu Asya tip CagA'nın Batı tip

CagA'dan daha fazla toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir(89). Doğu Asya ülkelerinde mide kanseri insidansının Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'ya göre nispeten yüksek olmasına bağlı olarak, Doğu Asya kökenlerinin Batı kökenlerine göre daha virulan olduğu düşünülmektedir(79,90). Ayrıca Doğu Asya tip CagA taşıyan *H. pylori* kökenlerinin Batı tip CagA taşıyan *H. pylori* kökenlerine göre gastrik epitel hücrelerinden daha yüksek miktarda IL-8 salgılanmasına neden olduğu bildirilmiştir(87).

EPIYA-C ve EPIYA-D primer CagA fosforilasyon bölgeleridir ve SHP-2 bağlanması için gereklidir(90,91). EPIYA-C segment sayısındaki varyasyonlar fosforilasyona bağımlı ve fosforilasyondan bağımsız yolda CagA'nın biyolojik aktivitesini belirlemektedir(70,88). Ayrıca CagA EPIYA-C segment sayısının Batı kökenleri arasında kanser riski açısından önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir(71,92). Batı izolatlarındaki EPIYA-C motifleri sayısının artması ve hastalık şiddeti ile CagA tirozin fosforilasyon seviyeleri, SHP-2'yi bağlama aktivite ve sinekkuşu fenotip olarak bilinen sitoskeletal değişiklikler açısından korelasyon vardır(63,81,91).

Ayrıca Doğu Asya tip CagA'nın EPIYA-D segmenti, EPIYA-C segmenti içeren Batı tip CagA'dan daha güçlü SHP-2 bağlama aktivitesi göstermektedir ve gastrik epitel hücrelerinde daha büyük ölçüde sinekkuşu fenotip oluşumunu indüklemektedir(75,92).

CagA, SH2 domaini aracılığıyla C-terminal Src kinazlarla da etkileşime girmektedir ve c-Src protein tirozin kinazın inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bu kinaz CagA'nın tirozin fosforilasyonuna aracılık etmektedir ve bunun inaktivasyonu CagA'nın fosforilasyonunda azalmaya neden olmaktadır, böylece CagA'nın aktivitesinin düzenlenmesinde feedback döngü sağlanmaktadır(1,93). Böyle konak-patojen etkileşimi virulansın kontrolünü sağlamaktadır ve hayat boyu kolonizasyona katkıda bulunabilmektedir(1).

Tirozin fosforilasyonu bağımlı aktivitelere ek olarak CagA, tirozin fosforilasyonundan bağımsız bir şekilde de hücre fonksiyonlarını bozmaktadır. Örneğin, CagA proteini, apikal kavşakları ve hücre-hücre temasını bozarak normal epitel hücre yapısını yok etmektedir. CagA protein aynı zamanda, fosforilasyondan bağımsız bir şekilde kalsinörini uyararak aktive T hücrelerinin nükleer faktörü ve aynı zamanda IL-8 gibi proenflamatuvar sitokinleri indükleyen NF-kB'yi aktive etmektedir(94). CagA polarite regülatör PAR1b/MARK2 kinazı da inhibe ederek epitelyal hücre polarite

kaybına neden olmaktadır ve normal epitel yapısının bozulmasında rol oynamaktadır(37,70).

CagA'nın hücreye translokasyonu için yapılan çalışmalarda, T4SS için reseptör olarak konak hücre yüzeyinde bulunan  $\beta 1$  integrinlerin gerekli olduğu görülmüştür(95,96). Buna ek olarak, efektör CagA proteini hem  $\beta 1$  integrin hem de membran-bağlantılı fosfatidilserin ile etkileşime girebilmektedir(96). Bu nedenle, CagA'nın rastgele değil oldukça sıkı kontrol edilen bir yolla konak hücrelere enjekte edildiği düşünülmektedir(97).

### 2.5.3.2. vacA Geni (Vakuol Oluşturucu Sitotoksin A Geni) ve VacA Proteini

*H. pylori* kökenlerinin yaklaşık %50'sinden salgılanan ekstrasellüler bir toksin olan VacA proteini, vacA geni tarafından kodlanan yaklaşık 95-kDa büyüklüğünde son derece immünojenik bir proteindir ve epitel hücrelerinde büyük vakuolizasyon oluşumunu uyarmaktadır(1,6). Bu protein bütün ekstrasellüler toksinler gibi iki parçalıdır. Küçük parça-p37 apoptozisten sorumlu iken, p58 olarak tanımlanan büyük parça küçük parça ile birlikte vakuolizasyondan sorumludur(2). VacA protein, peptik ülser ve mide kanseri patogenezinde önemli rol oynamaktadır(1,98). *H. pylori* kökenlerinde iki genetik element birbirleri ile kesinlikle bağlantılı olmasa da VacA genellikle CagA ile birlikte TipI kökenlerde aktif olarak üretilmektedir(2). VacA proteininin in vitro olarak *H. pylori*'nin üremesi için gerekli olmamasına karşın gastrik kolonizasyon için önemli ölçüde katkısı olduğu bildirilmiştir(99). VacA proteininin aktiviteleri; membran kanal oluşumu, endozomal ve lizozomal aktivitenin bozulması, integrin reseptöre etkileri, indüklenen hücre sinyalizasyonu, hücre fonksiyonlarına bağlı hücre iskeleti ile etkileşim, apoptozis indüksiyonu ve immün modülasyondur(1).

VacA proteini 140 kDa'luk protoksin olarak üretilmektedir, parçalanarak olgun şekli olan 95 kDa olarak salgılanmaktadır(1). Fonksiyonel vacA geni tüm kökenlerde bulunmasına karşın kökenlerin vakuolizasyon aktivitelerinde önemli varyasyonlar vardır ve ancak % 50'si VacA toksini üretmektedir(1,2,6). Toksin üreten şuşlarla toksin üretmeyen kökenler arasında önemli farklar vardır. vacA geni mozaik yapıdadır ve heterojenite gösteren 2 gen parçası vardır. Genin 5'-amino ucuna yerleşmiş "S" bölgesi sinyal peptidini kodlar, s1 ve s2 allelleri bulunmaktadır(1,6). s1 kendi içinde s1a, s1b ve s1c olarak subtiplere ayrılmaktadır(2,6). Genin orta bölgesinde bulunan "m" bölgesinde

ise m1 (m1a ve m1b subtipleri) ve m2 allelleri bulunmaktadır(1,2,6). Kuzey Avrupa, İngiltere, İrlanda ve İskoçya gibi Avrupa kökenlerinin çoğunda s1a, Merkezi ve Güney Afrika kökenlerinde s1b allelllerinin kombinasyonları görülürken, Asya kökenlerinin % 80'inden fazlasında ise s1c alleli hakimdir. Asya kökenleri arasında s1c ve m1 allelleri, gerek çocuklarda gerekse yetişkinlerde görülen duodenal ülserle ilişkili kökenlerde daha yüksek prevalansta bulunmuştur(2,100).

vacA s1 alleli, özellikle s1/m1 kombinasyonu s2 allele göre daha fazla toksin üretmektedir. Batı toplumlarında vacA s1/m1 türü ile toksin aktivitesi ve *H. pylori*'nin patogenezi arasında güçlü bir korelasyon vardır. Aktif toksini salan vacA geninin s1 tipini barındıran kökenler ve peptik ülser daha yüksek oranda ilişkilidir(1,6,101). Nontoksijenik olan vacA geninin s2 tipi ise zayıf enflamasyona neden olmaktadır ve nadiren peptik ülser ile ilişkilidir. Toksin-pozitif ve toksin-negatif kökenlerde büyük farklılıklar vardır(6) Vakuolizasyon aktivitesi s1/m1 genotiplerinde yüksek, s1/m2 genotiplerinde orta seviyede ve s2/m2 genotiplerinde ise yoktur. Bu doğrultuda, vacA s1/m1 genotipleri peptik ülser ve mide kanseri ile daha sıklıkla ilişkilidir(1,2). Bakterinin hızlı evriminden dolayı VacA ekspresyon düzeyleri zaman içinde farklılık göstermektedir, bu da persistan enfeksiyon kolaylaştırmak için genetik bir adaptasyondur. Bu mikroevrim toksisitenin değişmesi ile sonuçlanmaktadır ve değişen toksisite ile sürekli büyüyen ve küçülen ülserler açıklanabilmektedir(1).

Ribozomlarda üretilen protoksin, toksinin 33 kDa'luk N-terminal uçtan ve 55 kDa'luk C-terminal uçtan proteolitik enzimler tarafından kesilmektedir. N-terminal protein anyon kanallarının oluşumunda önemli bir rol alırken C-terminal protein hücreye bağlanmaya aracılık etmektedir. Proteolitik parçalanmaya karşın, bu parçalar non-kovalent bir şekilde birbiri ile ilişkili kalmaktadır. Purifiye VacA spontan olarak oligomerik agregatlar (>900 kDa) oluşturmaktadır ve asidik pH'ya maruz kaldığında birbirinden ayrılan aktif monomerler hücre zarında porlar oluşturur. Bu oto-agregasyon ve izleyen asit aktivasyonu toksik aktivite için önemlidir(1).

VacA epitel hücre zarında gözenekler oluşturmaktadır ve böylece konak hücrelerden üre ve anyonların salınımını indüklemektedir. Ayrıca, besin ve katyonların salınımına yol açan transsellüler geçirgenliği de arttırmaktadır. Salgılanan toksinin önemli bir bölümü çevreye salınmamakta ve bakterinin dış zarı ile bağlantılı kalmaktadır. Bakteri konak hücre ile temas ettiğinde, toksin kümelenerek konak hücre yüzeyine aktarılır ve toksik aktivite için kullanılmaktadır. Bu temas bağımlı doğrudan

salınım mekanizmasına spesifik reseptörler aracılık etmektedir. Bu reseptörler arasında p250 olarak adlandırılan 250 kDa ağırlığında bir yüzey glikoproteini, “reseptör protein-trozin fosfataz  $\beta$  (RPTP- $\beta$ )” ve “reseptör protein-trozin fosfataz Z” “RPTP-Z” (PTPz) yer almaktadır(1,6).

VacA'nın endozom ve lizozomların aktiviteleri üzerine olan etkisi epitel hücrelerinde vakuolizasyona yol açmaktadır. VacA endozomal vezikülere eklenmekte, klor kanalı aktivitesi ile porlar oluşturmakta, endozom içerisindeki anyonların kompozisyonunu değiştirmekte ve arkasından ozmotik şişmeye yol açmaktadır. Endozom üzerine etkilerine ek olarak VacA toksini aynı zamanda konak hücrede apoptozisi indüklemektedir ve bunu mitokondri membranında por oluşturarak ve indirek olarak pro-apoptotik sinyal moleküllerinin aktivasyonu yoluyla gerçekleştirmektedir(1,6).

VacA gastrik epitel hücreleri dışında derin dokulara penetre olarak granülositler, monositler, B hücreleri ve T hücreleri gibi diğer hücre tipleri ile etkileşebilmektedir. VacA'nın bu bağışıklık hücreleri etkileşimi antijen sunumunun, T hücre proliferasyonunun ve lenfosit aktivasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır(1,6).

### **2.5.3.3. babA Geni (Kan Grup Antijeni Bağlayan Adezin Geni)**

babA geninin babA1 ve babA2 olmak üzere 2 alleli vardır fakat aktif olan babA2 genidir ve bakteriyel adezyon proteini olan BabA proteinini kodlamaktadır(1,6). babA2 alleli ve peptik ülser, gastrik adenokarsinom ile yakın ilişkili olduğu için, BabA'nın *H. pylori* virülansında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir(102). Yapılan çalışmalarda *H. pylori*'nin Tip 1 köken olarak tanımlanan vacA s1+, cagA+, babA2+ kökenlerinin hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu görülmüştür(103). *H. pylori*'de BabA'nın varlığı ile glandular atrofi, intestinal metaplazi, artmış epitel proliferasyonu, duodenal ülser ve adenokarsinomun ilişkili olduğu bulunmuştur(6,102)

### **2.5.3.4. iceA Geni (Epitele Temasla İndüklenen A Geni)**

*H. pylori*'nin önemli virülans faktörlerinden bir diğeri olan iceA geni, gastrik epitel hücre ile temas sonrası uyarılan bir restriksiyon metilasyon genidir. Genin iceA1 ve iceA2 olarak iki alleli bulunmaktadır. Bu allellerin virülansa katkıları ve klinik



önemleri tartışılmalıdır. Batı toplumlarından izole edilen kökenlerde *iceA1* varlığı peptik ülser ve gastrik kanser için bir risk faktörü olarak gösterilirken, görülme sıklığı giderek artan *iceA2* ise, daha çok non-ülser dispepsili hastalardan izole edilen kökenlerde görülmektedir(2,65). *cagA*, *vacAs1/m1*, *iceA1* geni taşıyan kökenlerin daha virulan olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir(104).

#### **2.5.3.5. oipA Geni (Dış Enflamatuar Protein A Geni)**

*H. pylori* hücre duvarında yer alan *oipA* geninin kodladığı OipA proteini, 34-kDa Hop protein ailesinin üyesi bir adezindir ancak proenflamatuar yanıtı indükleyici protein olarak tespit edilmiştir(44). *cagPAI* gibi IL-8 ekspresyonunda rol oynamaktadır ve OipA'nın inaktivasyonu ile IL-8 üretiminin % 40 oranında azaldığı gösterilmiştir(1,105).

#### **2.5.3.6. HP-NAP( *H. pylori* Nötrofil-Aktive Edici Protein)**

*H. pylori*-NAP olarak tanımlanan, bakteriyoferritin gen ailesinden olan *napA* geni tarafından kodlanan 150 kDa büyüklüğünde bir protein, nötrofillerin yüzeyinde CD11b ve CD18 ekspresyonunu artırarak, nötrofillerin endotel hücreye bağlanmasını kolaylaştırmaktadır(106).

## **2.6. İmmün Yanıt**

### **2.6.1. İmmün Yanıt Mekanizması**

*H. pylori* ile enfekte konakta güçlü lokal bir immün yanıt oluşmasına karşın, bakteri çeşitli mekanizmlarla enfeksiyonu yıllarca sürdürebilme yeteneğine sahiptir. Oluşan immün yanıt; bakteriyi kolonize olduğu bölgeden uzaklaştırmak yerine enfekte bireylerde gastrik mukozal patolojilerin gelişmesine neden olmaktadır. *H. pylori*, çoğu gastrointestinal sistem patojenlerinden farklı olarak, mide epitel hücrelerine invaze olmadan sadece hücrelerin dış yüzeylerine adezyon göstermektedir(1,6).

*H. pylori* enfeksiyonu, konakta doğal ve kazanılmış immün yanıt mekanizmalarını indüklemektedir. Oluşan immün yanıtta özgül antikor oluşumu, gastrik mukozaya nötrofil, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ve epitel hücrelerinden sitokin

salınımı gözlenmektedir(107). Enfekte bireylerde oluşan özgül immün yanıtta ve kronik enflamatuvar yanıtta karşın, enfeksiyonun ortadan kaldırılması her zaman mümkün olmamaktadır. *H. pylori* gastrik mukozanın asidik ortamında yaşayabilme ve aynı zamanda konağın bağışık yanıtından kaçabilme yeteneğine sahiptir. Gastrik epitel hücreler, *H. pylori* ve konak arasındaki ilk bağlantı noktasıdır ve bakteriye karşı doğal bağışık yanıtta önemli rol oynamaktadır. Gastrik epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan Toll-like reseptörler, patojenle ilişkili moleküler yapıları tanıyabilmektedir(7).

*H. pylori*'nin virülans faktörleri arasında yer alan VacA mukus tabakasında salgılanmaktadır, düşük pH'da aktive olur ve gastrik epitel hücrelerine bağlanmaktadır. Bu hücrelere CagA'yı içeren *H. pylori*'nin bağlanması ile konak hücre sitozolü içerisine efektör protein CagA'yı gönderen T4SS aktive olmaktadır. Sinyal yolağı IL-8 salgılanmasını aktive etmektedir. IL-8, HP-NAP ve üreaz enzimi ile birlikte midedeki fagosit ve mast hücrelerinin lamina propria tabakasına göçünde rol oynamaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu, IL-6, IL-8, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) ve TNF- $\alpha$ 'yı uyararak nötrofil, mononükleer fagosit ve lenfositlerin gastrik mukozada toplanmasına ve IgG ile salgısal IgA üretimine neden olmaktadır. Bol miktarda nötrofil epitelin içinden geçerek mukus tabakaya girmektedir; makrofajlar ise doku hasarı ve ülserasyon bölgesinde bakterilerle karşılaşmaktadır. Antijen sunan hücreler ve T lenfositlerinin lamina propriaya gelmesine karşın, VacA, antijen sunumunu bloke ederek T hücre aktivasyonunun baskılanmasına, dolayısıyla kazanılmış bağışık yanıtın engellenmesine yol açmaktadır. B hücreleri ise enfeksiyonun geç döneminde hasarlı epitele ulaşmaktadır(7). *H. pylori* ağırlıklı olarak IgA ve IgG spesifik antikor oluşumunu uyarmaktadır(108). Gastrik enflamasyonun akut fazında mukozal CagA-spesifik IgA antikorlarının üretildiği gösterilmiştir(109,110). Ayrıca enfekte bireylerde % 90'dan fazla *H. pylori*-spesifik IgG antikorları üretilmektedir(111).

### 2.6.2. İmmün Yanıtta Rol Alan Sitokinler

Th-0 naif hücreleri antijen sunumu olduğu bölgedeki üretilen sitokinlere bağlı olarak Th1, Th2, Th17, Treg olmak üzere belirli Th alt kümelerine farklılaşabilmektedir. Th hücreleri, enflamasyon ve bellek B hücrelerini kontrol eden bağışıklık sisteminin önemli bir düzenleyicisidir(112). Genellikle virüslerin oluşturduğu intraselüler enfeksiyonlarda Th1 hücreleri, bakteriyel veya parazit kaynaklı

ekstrasellüler enfeksiyonlarda ise Th2 hücreleri immün yanıtta sorumludur. Th1 hücreleri interlökin-12 (IL-12) tarafından uyarılmakta ve ağırlıklı olarak interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ve IL-2 salgılamaktadır, Th2 hücreleri ise IL-4 tarafından uyarılmakta ve IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılamaktadır. Th1 ve Th2 hücreleri birbirlerini çapraz regüle etmektedir. Th1 hücrelerinin salgıladığı IFN- $\gamma$  doğrudan IL-4 üretimini baskılamakta ve böylece naif Th hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasını inhibe etmektedir. Buna karşılık IL-4, IFN- $\gamma$  sekresyonunu inhibe etmekte ve Th1 hücrelerinin aktivitesini engellemektedir(113).

*H. pylori* enfeksiyonunda immün yanıtta hem Th1 ve hem de Th2 görev alsa da, gastrik epitel enflamasyonunda Th1 tip immün cevabın dominant olduğu gözlenmiş ve T hücrelerince üretilen sitokinlerin nötrofil ve mononükleer hücre infiltrasyonunda esas rol aldığı bildirilmiştir(7,114,115). Hayvan modeli çalışmalarda ve insanlarda yapılan çalışmalardaki destekleyici veriler güçlü Th1 yanıtının gastritin şiddetini ve kanser riskini arttırdığını göstermiştir(111,116). *H. pylori*'nin indüklediği Th2 yanıtı; hafif gastrit tablosu, yüksek *H. pylori* kolonizasyonu ve düşük gastrik kanser riski ile ilişkilidir(11). Farklı popülasyonlarda *H. pylori* enfeksiyonu immün yanıtında varyasyonlar vardır. Örneğin, *H. pylori* enfeksiyonu immün yanıtında özellikle Th1 yanıtı gözlenen Avrupa popülasyonundan farklı olarak Afrika popülasyonunda ağırlıklı olarak Th2 yanıtı gözlenmektedir(117).

*H. pylori* güçlü bir T-hücre aracılı immün yanıtı indüklemekte, fakat bakterinin ortadan kaldırılmasında bu yanıt etkisiz kalmaktadır. Bu konuda farklı mekanizmaların rolü vardır. Birincisi; *H. pylori*, LPS'inde bulunan kan grubu Lewis x antijeni aracılığıyla gastrik dendritik hücrelerde, dendritik hücreye özgül intrasellüler adezyon molekülü 3 (ICAM-3) bağlayan integrin olmayan (DC-SIGN) lektin dendritik hücre reseptörüne bağlanmaktadır. *H. pylori*'nin LPS'inin DC-SIGN ile etkileşimi, Th1/Th2 dengesini değiştirebilmekte ve Th1 gelişimini durdurabilmekte, böylece patojenin sürekliliğine olanak sağlayabilmektedir(7). Tüm *H. pylori* kökenleri Lewis antijenlerini taşımaz, bu nedenle Lewis negatif varyantlar Lewis pozitif varyantlara göre Th1 yanıtını daha güçlü indüklemektedir(11,12,43) İkincisi; *H. pylori* mononükleer hücreler aracılığıyla siklooksijenaz-2 üretimini stimüle ederek Th1 polarizasyonunu azaltabilmektedir(118,119). Üçüncüsü; *H. pylori* düzenleyici T (Treg) hücre yanıtını uyarabilmektedir(120). Treg hücrelerin varlığında, bellek Th hücreleri aracılığıyla *H.*

*pylori* ile enfekte kişilerde *H. pylori* ile enfekte olmayan kişilere göre daha düşük miktarlarda IFN- $\gamma$  salgılanmaktadır(11,120).

IFN- $\gamma$  Th1 hücreleri tarafından üretilen immün sistemi düzenleyen ve immün yanıtı arttıran bir sitokindir. *H. pylori* enfeksiyonu Th1 hücrelerinde hastalık sürecinde önemli rol alan IFN- $\gamma$  üretimini uyarmaktadır. *H. pylori*'nin, IFN- $\gamma$  ekspresyon defektli farelerde daha az gastrik enflamasyon şiddeti ve yüksek oranda bakteriyel kolonizasyonu saptanmıştır(17,121). Tek başına IFN- $\gamma$  gastrik enflamasyonu ve atrofiyi indükleyebilmektedir. Ayrıca, IFN- $\gamma$  makrofaj aktivasyonu aracılığıyla dolaylı olarak gastrik enflamasyonun şiddetini module etmekte ve transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gibi anti-enflamatuar faktörlerin ekspresyonunu baskılayabilmektedir(17,122). Hayvan modelli bir çalışmada IFN- $\gamma$ 'nın gastritin şiddetinin artmasında önemi vurgulanmıştır(116) *H. pylori*'ye özgül aktive T hücreleri IFN- $\gamma$  eksprese ederken, IL-4 ya da IL-5 eksprese etmediği gösterilmiştir(7,115).

IL-1 esas olarak makrofajlar tarafından üretilen ve pek çok hedef hücrenin farklılaşmasını ve özgül ürünler sentezlemesini sağlaması yanında özellikle T hücrelerini farklılaşma ve IL-2 üretme yönünden etkinleştiren bir proteindir. Prostaglandin sentezi gibi enflamatuar cevapları indüklemekte, lökositlerin endotel hücrelerinde adezyonunu sağlamakta ve vasküler geçirgenlikte artış sağlayarak nötrofil ve makrofajların bölgeye göçüne neden olmaktadır. TNF de esas olarak makrofajlar ve T lenfositler tarafından sentezlenerek nötrofillerin fagositoz ve öldürme etkinliklerini aktifleştiren proenflamatuar bir sitokindir(113). Gastrik mukozada sekrete edilen IL-1 ve TNF- $\alpha$  *H. pylori* enfeksiyonunda enflamatuar cevabı başlatma ve güçlendirmede anahtar rol oynamaktadır. IL-1 $\beta$ 'nin gastrik asit sekresyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmesi ve bazı allellerin IL-1 $\beta$  üretimini baskılaması ve böylece gastrik asit sekresyonunun indüklenmesi duodenal ülser için risk allelleri olarak düşünülürken bunun tam tersi durumlarda IL-1 $\beta$  üretimini aşırı tetikleyen polimorfizm durumlarında hipoklorhidri ve atrofik gastritin tetiklediği neoplastik dönüşümde artma gözlenmektedir(123,124). TNF- $\alpha$  da, *H.pylori* enfeksiyonunda daha zayıf olmakla birlikte, IL-1 $\beta$  gibi gastrik asit üzerine inhibitör etkisi bulunmaktadır(1,125)

IL-4 aktive Th2 hücreleri tarafından üretilen ve antikor üretimini uyaran bir proteindir. *H. pylori* ile enfekte IL-4 - / - farelerde daha şiddetli gastrik enflamasyon geliştiği ve IL-4 yokluğunda Th dengesinin Th1'e doğru olduğu ve enflamasyonda artışa neden olduğu gösterilmiştir(16).

IL-6 makrofajlar ve Th lenfositler tarafından üretilir ve B hücrelerinin farklılaşmasını uyarmaktadır. Gastrik adenokarsinomalı hastalarda artmış IL-6 seviyeleri bildirilmiştir(126).

IL-8, nötrofiller ve lenfositler için güçlü bir kemotaktik faktördür. Bu kemokin antijen sunan hücreler ve endotel hücreleri tarafından salgılanmaktadır. IL-8 nötrofillerin vasküler endotel hücrelerine adezyonunu arttırmaktadır. Sonra nötrofiller bölgeye göç ederek enflame dokuya girmektedir(113). *H. pylori* epitel hücreleri ile temas ettiğinde bu hücrelerden IL-8 gibi sitokinlerin üretimi başlamaktadır(128). cagPAI gastrik epitelden yüksek seviyede IL-8 sekresyonunu uyarmaktadır(13,53). OipA'nın da IL-8 sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir(18,44,105). Duodenal ülser ve nazofarenks karsinomu riskinin artışı ile ilişkili olarak polimorfizmlerin IL-8 gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir(128,129).

IL-12, hücre-içi patojen enfeksiyonlarına karşı gelişen yanıtta antijen sunan hücreler tarafından üretilen heterodimerik bir sitokindir. IL-12, naif T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasına ve IFN- $\gamma$  üretiminin tetiklenmesine yardımcı olmaktadır. IFN- $\gamma$  ve IL-12 birlikte sadece Th1 hücrelerin farklılaşmasını indüklememekte, aynı zamanda Th2 yanıtını da inhibe etmektedir. IL-12; p35 ve p40 (IL-23'de de bulunur) olmak üzere iki alt birimden oluşmakta ve bu alt birimler IL-12A ve IL-12B genleri tarafından kodlanmaktadır. Her iki alt birim üretimi biyolojik olarak aktif bir heterodimer olan p70 oluşturmak için gereklidir(113,130). *H. pylori*'nin HP-NAP'nin nötrofil ve monositlerden IL-12 üretiminin indüklenmesinde önemli bir rol oynadığı ve böylece Th1 yönünde immün yanıtın geliştiği gösterilmiştir(131). Ayrıca, IL-12 polimorfizmleri ile gastrik kanser riski arasında bir ilişki bulunmuştur(132). Dendritik hücreler özel antijen-sunan lökositlerdir ve immün yanıtın gelişiminde temel fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Bu hücreler, gastrointestinal mukoza, deri, lenfoid dokuda bulunmaktadır. Dendritik hücreler *H. pylori* ile bağışıklık sisteminin ilk etkileşime giren hücreleridir ve IL-12 salgılamaktadır(133). Gastrik mukozadaki IL-12'nin üretimi Th1 yanıtının gelişmesini sağlamakta ve cagPAI pozitif kökenler ile ilişkilidir(134). Th1 yanıtı ise *H. pylori*'ye bağlı hastalıkların oluşmasına neden olan enflamatuvar değişikliklerin meydana gelmesini sağlamaktadır(12,16).

Th0 ve Th1 CD4+ T lenfositlerinin aktivasyonu sonucu üretilen IL-17, makrofaj, fibroblast, endotel ve epitel hücreleri üzerinde biyolojik aktivite göstermektedir. IL-17, epitel hücre ve makrofajlardan IL-8 üretimini uyarma yeteneğine

sahiptir. Ayrıca IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , prostoglandin E2, ICAM-1 ve siklooksijenaz 2 (COX-2) sentezini de uyarmaktadır. Bu nedenle IL-17'nin, T hücre aktivasyonu ve enflamatuvar yanıt arasında bir ilişki sağladığı düşünülmektedir(7).

Sitokin sentez inhibitör faktörü olarak bilinen IL-10, naif T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını stimüle eden IFN- $\gamma$  ve IL-2'nin, kemik iliğinden T hücrelerinin büyüme ve farklılaşma destekleyen IL-3'ün, sistemik enflamasyonda yer alan ve akut faz reaksiyonunu uyaran sitokinlerden biri olan TNF- $\alpha$ 'nın sentezini inhibe etmektedir. IL-10 başlıca Th2, monositler ve mast hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Ayrıca, IL-10 MHC moleküllerinin ekspresyonunu baskılayabilmekte ve böylece antijen sunumunu engelleyebilmektedir(113). IL-10 eksikliği olan farelerde enflamatuvar yanıtın *H. pylori*'yi başarılı ve hızlı bir şekilde temizlemeye yeterli olduğu gösterilmiştir(135). Dolayısıyla, IL-10 *H. pylori* kolonizasyonunu arttırabilmektedir. Normalden daha düşük ekspresyon seviyelerine neden olan IL-10 polimorfizmleri, intestinal metaplazi riskinde artış ile ilişkili bulunmuştur(136).

## 2.7. Yaptığı Hastalıklar

*H. pylori*'nin mide kolonizasyonu sıklıkla asemptomatik seyrederken, taşıyıcıların ancak % 15-20'sinde hayatının herhangi bir döneminde gastroduodenal hastalık tablosu oluşmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu sonrası kronik-aktif gastrit gelişmektedir, enfekte olan hastaların tümünde histolojik olarak tanımlanabilen gastrik enflamasyon bulunurken bu enflamasyon çoğunlukla asemptomatiktir. Pigtail macaque ve Rhesus maymunları ile yapılan deneysel çalışmalarda *H. pylori*'nin yüzeysel gastrite yol açtığı ispatlanmıştır. Rhesus maymunlarında *H. pylori* enfeksiyonu ile yaratılan gastritin *H. pylori* eradikasyonu ile iyileşme sürecine girdiği ispatlanmıştır(2,56).

*H. pylori* ve değişik gastroduodenal hastalıkların ortaya çıkmasında bir çok faktör birlikte rol almaktadır. *H. pylori* patogenezi bakteriye ait güçlü antijenik özelliğe sahip toksin, enzim ve yapısal elemanların yarattığı kronik enflamasyon midedeki doku hasarından sorumludur. İmmunopatogenezi dışında, *H. pylori* enfeksiyonu esnasında 4-4.5'a kadar yükselen mide pH'ı, midede metabolitlerinin artışına izin vermektedir. Bu metabolitler içerisinde bulunan nitrat ve nitritler çeşitli gıdalar veya ilaçlarla alınan aminler ve amidlerle birleşerek karsinojen nitrozo aminler ve nitrik oksid radikalleri (NOS) gibi N-nitrozo bileşikleri oluşturmaktadır. Kronik enflamasyonda yer alan

polimorf nüveli lokositler, lenfositler ve makrofajların yarattığı oksijen ve nitrik oksit radikalleri de NOS'lar gibi mukozal hücrelerde hasarı ve neoplastik transformasyonu tetikleyebilmektedir. Diğer taraftan *H. pylori* ile enfekte hastalarda mukozal askorbik asit miktarının düştüğü ve lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu metabolitlerdeki değişim de karsinogenezi tetiklemektedir. Bu olaylar sonucunda *H. pylori* ile kolonize kişilerin % 2-4'ünde, kronik aktif gastritle başlayan gastrik kolonizasyon yaklaşık 10 yıllık bir süre içerisinde mukoza hücrelerindeki hasara bağlı olarak diffüz veya intestinal tip adenokarsinoma ile sonlanabilmektedir(1,2,56).

*H. pylori* insanlarda gastrik kolonizasyonuna bağlı olarak asemptomatik taşıyıcılıktan nonülser dispepsiye, kronik gastritten, aktif akut atrofik gastrite, peptik ülserden MALT lenfoma ve gastrik karsinomaya kadar değişen spektrumda gastroduodenal patolojilere sebep olmaktadır. Ayrıca, fundusdaki lokalizasyonları ile mide-özefagus reflü ve üst gastrointestinal sistem karsinomaları ile de ilişkisi gösterilmiştir(137,138).

### 2.7.1. Akut Enfeksiyon

Çoğunlukla akut dönem asemptomatiktir. Bazı hastalarda bulantı, kusma, üst karın bölgesinde ağrı, şişkinlik, ağrı gibi semptomlarla karakterize üst gastro-intestinal sistem hastalığı gelişebilmektedir. Semptomlar 3-14 gün, genellikle bir haftadan az sürmekte, besin zehirlenmesi tablosuna benzetilebilmektedir. Alındıktan sonra bakteri yıllarca midede kalarak, kolonizasyona karşı doku ve serolojik yanıt oluşturmaktadır(25,27,106).

### 2.7.2. Gastrit

En çok görülen *H. pylori* enfeksiyon kliniği kronik gastrit şeklindedir. Enfekte kişilerin hemen hemen tamamında gastrite yol açmakta, gastritin olduğu bölgeye ve meydana gelen hasarın şiddetine göre duodenum ülseri, gastrik ülser, atrofik gastrit, mide kanseri, MALT gibi patolojiler meydana gelebilmektedir ancak çoğunlukla gastrit asemptomatik süperfisial gastrit şeklinde sonuçlanmaktadır(1,6,25,106).

Gastrik mukozada görülen enflamatuvar patolojileri içine alan gastrit için eroziv, non-eroziv ve spesifik histopatolojik değişikliklerin olduğu yüzeysel, diffüz,

panmukozal, atrofik gastrit gibi veya morfolojik ve topografik özelliklere göre tip A, tip B gibi ya da patogeneze ve/veya klinikle ilgili sınıflandırmalar gibi değişik sınıflandırmalardan sonra en son olarak Sydney sistemine göre sınıflandırma yapılmıştır. Sydney Klasifikasyon Sistemi (1990) ile gastrit etyopatogenezinde *H. pylori*'nin varlığı da dikkate alınmış ve gastrik patolojiler, histopatolojik ve endoskopik olarak iki ayrı grupta toplanmıştır. Bu sistemde gastritler akut, kronik ve spesifik olarak sınıflandırılmıştır(139).

*H. pylori*'nin gastrik dokuda yaptığı hasara ilişkin immunolojik ve patolojik deliller mevcuttur ve *H. pylori*; ya çeşitli sitotoksinler ve üreaz gibi enzimlerle direkt olarak veya otoimmün cevabı başlatarak indirekt yollarla gastrik mukozada hasara yol açmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonunun doğal seyri iki aşamalı olmaktadır. Akut fazda, geçici bir süre eşlik eden üst gastrointestinal semptomlarla beraber, yoğun bakteriyel proliferasyon ve gastrik enflamasyon görülmektedir. Bu aşamada midede hipoklorhidri gelişmektedir. Haftalar içinde, hastalığın ikinci aşaması olan kronik faza gidiş gözlenmekte ve enflamatuvar yanıt düşük dereceli yüzeysel gastrite gerileyerek, gastrik pH da normale dönmektedir. Enfekte bireyler asemptomatik hale gelmektedir, bu semptomsuz kronik enfeksiyon en sık rastlanan durumdur(1,6,25,106).

*H. pylori* genellikle korpusa göre asiditenin daha düşük olduğu antrum bölgesine yerleşmektedir. *H. pylori*'nin gastrik mukozada dağılımı homojen olmayıp genellikle yamalı bohça tarzında yerleşim göstermektedir. Mide biyopsi örneklerinde sıklıkla mukozal hücrelerde normal yapının kaybolduğu, hücrelerin düzensiz olarak dizildiği ve mukus içeriğinin azaldığı, bununla birlikte Lamina propria'nın kronik enflamasyonu karakterize eden hücreler ile infiltre olduğu gözlenmektedir. *H. pylori*, midede antrum ve korpus bölgelerindeki epitel hücrelerine bağlanarak lamina propiaya nötrofillerin yoğun göç etmesini sağlayarak akut nötrofilik gastrite neden olmaktadır ve akut gastrit esnasında midede belirgin bir hipoklorit vardır. Akut gastrit birkaç hafta ile birkaç ay arasında sürebilmektedir. Genellikle konağın enfeksiyona gösterdiği immun cevap yetersiz kaldığından enflamasyon, aktif kronik gastrite dönüşmektedir(1,6,25,27,106). Aktif kronik gastrit iki şekilde görülebilmektedir.

Antral Predominant Aktif Kronik Gastrit: *H. pylori* genellikle korpusa göre asiditenin daha düşük olduğu antrum bölgesine yerleşmektedir. Asit sekresyonunun fazla olması nedeniyle enfeksiyon esnasında duodenal ülser ile birlikte gelişebilmektedir(1,6,25,106).



Korpus Predominant Aktif Kronik Gastrit: Midede asit sekresyonunun azalması bakterinin korpus bölgesine daha kolay yerleşerek gastrit oluşturmaya neden olmaktadır. Enfeksiyon esnasında midede az miktarlarda asit salgılandığı durumlarda gastrik ülser oluşumu ile birlikte gelişebilmektedir. Midenin korpus bölgesinde gelişen gastritte gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve gastrik kanser gelişme riski söz konusudur(1,6,25,106).

### 2.7.3. Gastrik Ülser

Gastrik ülserli hastalar duodenal ülserli hastalardan daha az oranda *H. pylori* ile kolonizedirler. Gastrik ülserlerin en önemli nedeni nonsteroid ilaç veya aspirin kullanımınıdır. Bunun dışındaki hastalarda en sık neden *H. pylori* olarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal tedavi sonuçları duodenal ülserdekine benzerdir(1,6,25,106).

### 2.7.4. Duodenal Ülser

Duodenal ülserin nedenleri arasında, tedavi edilmeyen gastrit, fazla asit ve gastrin sekresyonu, mukozal direncin azalması, safra kesesi veya karaciğer yetersizliği, mide boşalmasının hızlı meydana gelmesi, *H. pylori* enfeksiyonu, non-steroid anti-enflamatuvar ilaç kullanımı, stres ve fazla miktarda sigara kullanımı bulunmaktadır. Genellikle başlangıç bölgesi olan bulbusda yerleşim söz konusudur. *H. pylori* ile ilişkisi daha fazladır(1,6,25,106).

Gastrik ve duodenal ülser genel olarak peptik ülser olarak da adlandırılmaktadır. Peptik ülser uzun yıllar ataklar şeklinde seyreden kronik bir hastalıktır. Mide bölgesindeki ağrı en karakteristik semptomdur. Çoğunlukla açlık ağrıları şeklindedir, uykudan uyandıran gece ağrıları da görülebilmektedir. Bir şey yemek, içmek ve anti-asitlerle ağrı geçmektedir. Kanama ve perforasyon gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilmekte, özellikle yaşlılarda bu komplikasyonlar ölümlerle sonuçlanabilmektedir(25).

*H. pylori* önce mukozada akut nötrofilik gastrit oluşumuna neden olurken, daha sonra mukus tabakayı delerek, epitel hücrelerine yerleşerek çoğalmaya başlamaktadır. İmmun yanıt bakteriyi eradike etmekte başarılı olamadığı için, kronik aktif gastrit gelişmektedir. *H. pylori* duodenumda gastrik epitelin olduğu metaplazi adacıklarında

kolonize olmakta ve duodenuma aşırı asit yüklenmesine bağlı olarak gastrik metaplazi gelişebilmektedir. Bakterinin duodenuma kolonizasyonu ve gastrik metaplazi sonrasında ülserin öncü lezyonu olan aktif duodenit gelişmektedir. Konağın ülsere karşı genetik duyarlılığı, çevresel faktörler, immün ve enflamatuvar yanıtın etkileriyle duodenit, duodenal ülsere dönüşebilmektedir(1,6).

*H. pylori* dokuları invaze etmediği halde, şiddetli bir enflamatuvar ve immün yanıtı neden olmaktadır. Üreyi parçalayarak amonyum klorür ve monokloramin gibi toksik maddelerin ortaya çıkmasına neden olan üreaz enzimini salgılamaktadır. Ayrıca yüzey epitel hücrelerine hasar veren fosfolipazları da arttırmaktadır. Bakteriyel proteazlar ve fosfolipazlar gastrik mukus içindeki glikoprotein-lipid komplekslerini parçalamakta ve böylece mukozal savunma sistemini zayıflatmada ilk aşamayı geçmektedirler. VacA de epitel hasarına neden olmaktadır. *H. pylori*, gastrik asit salgısını arttırmakta ve duodenumda bikarbonat üretimini azaltmaktadır(140).

*H. pylori* ile enfekte bir kişide yaşam boyu duodenal veya gastrik ülser gelişme riski ABD’de % 3, Japonya’da % 25 olarak bildirilmiştir(137). ABD’de duodenal ülselerin % 80’i, gastrik ülselerin % 60’dan fazlası bu organizma ile enfekte bulunmuştur(140). Çeşitli kohort çalışmalarında *H. pylori* ile enfekte kişilerde duodenal veya gastrik ülser gelişme riskinin 3 ila 10 kat arttığı bildirilmiştir(141). Duodenal ülseri olan hastaların % 95’inde *H. pylori* saptanmış ve *H. pylori* ile enfekte hastalarda eradikasyon tedavisi sonrası duodenal veya gastrik ülser rekürrens oranlarında anlamlı derecede düşüş olmuştur(1,25,142,143).

### **2.7.5. Gastrik Karsinoma**

Dünya genelinde mide karsinomu en sık görülen solit tümörler arasında ikinci sırada yer almaktadır. IACR 1994’de *H. pylori*’yi grup 1 karsinojenik olarak bildirmiştir. Atrofik gastrit ve intestinal metaplazi kansere zemin hazırlayan öncül değişikliklerdir. Özellikle son yıllarda antrum ve mide korpus kanseri oranlarındaki düşüş *H. pylori* prevalansındaki azalma ile paraleldir(25).

Kanser gelişiminde ana etkenin enfeksiyonun edinildiği yaş olduğu ve karsinogenez için uzun bir indüksiyon zamanı gerektiğini düşündüren sonuçlar vardır. Uzun süren *H. pylori* enfeksiyonunun kanser gelişiminde önemli bir risk faktörü olan, atrofi ve intestinal metaplaziye yol açtığı gösterilmiştir(6,143).

Yüksek gastrik kanser sıklığı olan popülasyonlarda *H. pylori* enfeksiyon prevalansının da yüksek ve *H. pylori* enfeksiyonu ve gastrik kanser ölüm oranıyla coğrafi bir uyum olduğu yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. *H. pylori* ile enfekte kişilerde 3-6 kat artmış gastrik kanser riski vardır ve gastrik kanserli hastaların % 50'sinde *H. pylori* pozitifliği bulunmaktadır(144). Prospektif çalışmalarla *H. pylori* kronik gastritinin, intestinal metaplazi ve atrofik gastrite doğru ilerlediği gözlenmiştir ve bu tür patolojik lezyonlar gastrik karsinomanın öncülü olarak kabul edilmektedir(145). Düşük asit yükü ve kronik *H. pylori* enfeksiyonu olan kişilerde intestinal metaplazi ve displazi görülme sıklığı artmaktadır. Aktif gastrit esnasında asit sekrete eden bezlerde zaman içinde atrofi gelişerek yerini fibrozise ve intestinal metaplaziye bırakmaktadır. Bu ortamda displazi meydana gelmekte ve kanser gelişmektedir(27,146).

*H. pylori*, üreaz enzimi aracılığı ile lokal pH artışına neden olmaktadır. Bu lokal pH değişikliği gastrin üzerindeki feed back engellemenin kalkması için yeterli olabilmektedir. *H. pylori* enfeksiyonu kan gastrin düzeyini yükseltmektedir. Bakteri, antral mukozada G ve/veya D hücreleri, oksintik mukozada ise parietal hücreler üzerinde direkt yada indirekt yollarla etkili olarak asit sekresyonunu bozmaktadır. Asit salgısının azalması ve mide ortamında oksidasyon-redüksiyon dengesinin bozulması ile mide mukozasında oksidatif zarara yol açmaktadır(147).

Normal mide, bir konsantrasyon gradientine karşı lümene, nitrit ve reaktif oksijen metabolitlerinin güçlü bir inhibitörü olan askorbik asit salgılamaktadır. *H. pylori* enfeksiyonunun midenin askorbik asit salgısını azalttığı, midedeki tüm serbest C vitamininin, inaktif dehidroaskorbik asit şeklinde bulunduğu gösterilmiştir. Ek olarak gastrit ve metaplazi ile birlikte mukus üretimindeki değişiklikler, karsinogenez veya luminal faktörlere mukozal yatkınlığı arttırabilmekteydiler. Bütün bu karsinogenik faktörler *H. pylori*'nin neden olduğu epitel hücre proliferasyonu ile birleştiğinde karsinogenez için gerekli zeminin oluştuğu düşünülmektedir(148,149). *H. pylori* ile mide mukozasının kolonizasyonu hemen her zaman lokal iltihap ile sonuçlanmaktadır. Kalıcı iltihap ise atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve distal yerleşimli mide kanseri riskini arttırmaktadır(149).

*H. pylori* enfeksiyonunun tüm dünyada yaygın olması ve çok fazla sayıda insanı etkilemesine karşın, enfekte hastaların ancak küçük bir bölümünde mide kanseri gelişmesi, özel bakteriyel ürünlerin salınmasına, konağın bakteriye cevabındaki

farklılıklara ya da konak ve bakteri arasındaki etkileşim farklılıklarına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. cagPAI içeren kökenlerin mide mukozasında daha güçlü iltihaba neden olmasının yanısıra, daha fazla epitel zararına, dolayısıyla da daha çok hücre proliferasyonuna yol açtığı saptanmıştır(69). Benzer şekilde TNF-a, IL-1 ve IL-8 gibi sitokinler ve fosfolipazlar epitel proliferasyonunu arttırmaktadır(149).

*H. pylori*'nin gösterilen en önemli etkilerinden birisi de gastrik epitelial hücre döngüsünü değiştirmesidir ve bu değişim sonucunda gastrik karsinoma riskinin arttığı kabul edilmektedir. Hücre döngüsündeki değişiklik, artmış apoptozis ve proliferasyon şeklindedir. *H. pylori*'nin hücre döngüsüne etkisi birkaç şekilde açıklanmaktadır;

1. *H. pylori* yarattığı kronik enflamasyon sonucu ortamda artan serbest oksijen radikallerinin yarattığı DNA hasarı ve sonuçta hücre ölümü

2. *H. pylori*'nin hücrelerle direkt teması sonucu hücre ölümü

3. *H. pylori*'nin toksinleri aracılığı ile oluşan doku hasarı ve hücre ölümü(149).

Bu ölümlerin tamamına yakını apoptozisle olmaktadır. Sonuçta gastrik epitelde hiperproliferatif bir durum oluşmaktadır. Erişkinlerde ve pediatrik yaş gruplarında yapılan çalışmalarda gastrik epitelial apoptozis ve proliferasyonun arttığı ve eradikasyonla bu parametrelerin normale dönmektedir(149).

Gastrik glandlardaki proliferatif zonda kök hücreler bulunmaktadır. Bu zon istmus ve boyun bölgesinde lokalizedir. Kök hücreler farklılaşma sinyali alınca iki yönlü göç etmektedir. Mukus hücreleri yukarıya doğru faveolar bölgeye, pariyatal hücreler ve bir kısım mukus hücresi glandın tabanına doğru göç etmektedir. Bu iki taraflı göç esnasında hücreler diferansiyasyonlarını tamamlamakta ve dereceli olarak proliferative kapasitelerini kaybetmektedir. Döngü 1-3 gün arasında değişmekte ve bu hücreler apoptozis ile ölmektedir. Bu nedenle apekte ve faveolar bölgede nadiren proliferatif hücre görülmektedir. Gastrik piti bölgelere ayırarak yapılan çalışmalarda proliferasyondaki anlamlı artışın faveolar bölgede olduğu, proliferative zonda anlamlı fark olmadığı belirtilmiştir. Normal yerde olmayan bu proliferasyon sonucu gastrik lümeneye en yakın hücreler proliferatörlükte ve bu hücreler dış etmenlere karşı daha hassas hale gelmektedir. Yani DNA hasarı olasılığı daha yüksektir. *H. pylori* gastrik epitelde hiperproliferasyona neden olmaktadır. Hiperproliferasyonun malignite gelişimine en önemli katkılarından biri; artan proliferasyon ile DNA onarım süresinin kısalmasıdır. Çok basamaklı karsinogenezde bu olay önemli rol oynayabilmektedir(149).

### 2.7.6. MALT Lenfoma

*H. pylori* enfeksiyonu ile direkt ilişkilendirilen ikinci tümöral oluşum mide lenfoması yani mukoza ile ilişkili lenfoid doku tümörüdür. Anatomik olarak normal mide dokusunda lenf dokusu bulunmamaktadır. *H. pylori*'nin neden olduğu gastritte, mukozal yüzeyde MALT adı verilen lenfoid foliküller ortaya çıkmaktadır. MALT lenfomanın *H. pylori* ile ilişkisi mide kanserinden çok daha belirgindir. Düşük dereceli B hücreli gastrik MALT lenfoma için *H. pylori*'yle enfekte olanların, olmayanlardan 6 kat daha fazla risk taşıdığı bildirilmiştir(27). MALT olan hastaların % 72-98'inde *H. pylori* pozitifliği, ortalama % 70'inde ise CagA+'lığı saptanmış, *H. pylori* eradikasyonundan sonra da olguların % 70-80'inde gerileme olduğu gözlenmiştir(150). Ayrıca patogeneizde *H. pylori*'nin neden olduğu kronik antijenik stimülasyonun rol oynadığı, buna bağlı olarak poliklonal lenfoit yanıtın uyarıldığı, sonrasında neoplastik transformasyonun geliştiği ileri sürülmektedir(25).

### 2.7.7. Gastro-özefageal Reflü Hastalığı (GÖRH)

Son yüzyılda *H. pylori* prevalansında azalma söz konusu olmakla birlikte, gastro-özofageal reflü hastalığı, Barrett özofagusu, özofagus adenokarsinomu oranlarında giderek artış olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda Cag+ kökenler ile Barrett özofagusu ve özofageal adenokarsinoma arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise duodenal ülserli hastalarda *H. pylori* eradikasyonundan sonra gastro-özofageal reflü görülme oranının iki kat arttığı, gastro-özofageal hastaların kontrol grubuna göre daha az oranda *H. pylori* ile kolonize oldukları gösterilmiştir(1,6,25). *H. pylori* eradikasyonu sonucu enfeksiyonun sıklığındaki azalmayla birlikte GÖRH insidansının artması, *H. pylori* enfeksiyonunu GÖRH gelişimine karşı koruyucu rol oynayabileceği şeklinde bir düşünce ortaya çıkmıştır(1). Bununla birlikte *H. pylori* enfeksiyonu ve GÖRH ilişkisine bakıldığında; GÖRH'e karşı koruyucu bir rolünün olmadığı, ya da bu organizmaya bağlı enfeksiyonun reflü hastalığını ortaya çıkarabileceği veya daha önce var olan reflü hastalığını alevlendirebileceği de ileri sürülmüştür(151,152).

### 2.7.8. Fonksiyonel Dispepsi

Fonksiyonel dispepside; bulantı, kusma, anoreksi, şişkinlik, dolgunluk, sıkıntı, yanma, çabuk doyma, geğirme, reflü (yanma, rejitasyon) ve ülser (epigastrik ağrı) benzeri semptomlar görülmektedir. Ülseri olmayan, ancak dispepsi yakınmaları olan hastaların %4-21'inde bir yıl içinde ülser geliştiği gösterilmiştir. Fonksiyonel dispepsi ve *H. pylori* arasındaki ilişkiye bakıldığında; *H. pylori* prevalansı düşük olan ülkelerde, fonksiyonel dispepsili hastalarla yapılan çalışmalarda *H. pylori* prevalansı kontrollere oranla daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda dispepsili olguların bir kısmında *H. pylori* eradikasyonunun semptomlarda azalmaya yol açtığı ve bunun plasebodan %10 daha etkili olduğu gösterilmiştir(1,6,25).

### 2.7.9. Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar

*H. pylori*'nin diğer hastalıklarla ilişkisine yönelik yapılmış pek çok çalışma olmakla birlikte, kesin kanıtlar bulunamamıştır. Koroner kalp hastalığı, demir eksikliği anemisi, pernisiyöz anemi, oto-immün trombositopenik anemi, ürtiker, skleroderma, rozasea, Raynaud fenomeni, migren, gıda allerjisi, Diabetes mellitus, tirodit, solunum yolları, merkezi sinir sistemi, deri yumuşak doku ve otoimmun hastalıklar *H. pylori* ile ilişkili olduğu ileri sürülen, ancak aralarındaki ilişki tam olarak açıklanamamış hastalıklardır(1,6,25,106,153, 154,155).

### 2.8. *H. pylori* Enfeksiyonlarında Tanı

*H. pylori* ile ilişkili gastroduodenal hastalıkların tanısı, klinik ve laboratuvar bulgularına dayanmaktadır. Enfeksiyonunun tanısına yardımcı olabilecek birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Bu testler, direkt yani invazif testler ve indirekt testler yani noninvaziv testler olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. İnvaziv girişim (endoskopi) gerektiren hızlı üreaz testi, histoloji, kültür, Polymerase Chain Reaction (PCR)'a dayanan testler ve mide dokusunun fazkontrast mikroskopisi gibi incelemeler ve invaziv olmayan seroloji, 13C ve 14C üre nefes testleri (ÜNT), "*H. pylori* Stool antijen testi" (HpSA) gibi çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. *H. pylori*'nin tespitinde altın standart kültür olmakla birlikte histopatolojik inceleme de oldukça önem taşımaktadır.

Tanıyı optimize etmek için genellikle birkaç testin birlikte kullanılması önerilmektedir(1,6,25,28,29,106)( Tablo 2-2).

**Tablo 2-2: *H. pylori* enfeksiyonunun varlığını göstermek için kullanılan testler(28)**

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Endoskopi gerekliliği	Yorum
Histoloji	93-98	95-98	Evet	Çok sayıda antral biyopsi örneği gerekir, özel boyalar duyarlılığı artırır.
Kültür	77-95	100	Evet	Antibiyotik duyarlılık testleri için ve ayrıntılı tiplendirme için gerekir.
Hızlı üreaz testi	89-98	93-98	Evet	Endoskopik işlem sırasında tanı için kullanılır.
<sup>13</sup> C-UBT*	90-95	90-95	Hayır	Canlı bakteri ve enfeksiyon varlığını gösterir, tedavi takibinde yararlıdır.
<sup>14</sup> C-UBT**	90-95	90-95	Hayır	<sup>13</sup> C-UBT ile benzer mekanizma, düşük dozda radyoaktif madde alınımı var, kısa dönemde antibiyotik tedavisinin takibinde kullanılmaz, epidemiyolojik çalışmalar için idealdir.
Seroloji	88-95	86-95	Hayır	Kısa dönemde antibiyotik tedavisinin takibinde kullanılmaz, epidemiyolojik çalışmalar için idealdir.
PCR yöntemleri	85-96	90-100	Evet (biyopsi) Hayır (tükürük)	<i>H. pylori</i> DNA'sının varlığını gösterir, ancak ölü bakterilerde pozitif sonuç verir, <i>H. pylori</i> suşlarının farklılığını belirlemede kullanılır.
Dışkı antijen testleri (monoklonal)	90-94	98-99	Hayır	İnvaziv olmaması bir avantajdır.

\* Üre soluk testi (UBT-Urea Breath Test). Karbon 13 ile işaretlenmiş üre.  
\*\* Üre soluk testi (UBT-Urea Breath Test). Karbon 14 ile işaretlenmiş üre.

### 2.8.1. *H. Pylori* Tanısında Kullanılan Klinik Örnekler

Mide biyopsi örnekleri: Gastrik *Helicobacter* türleri için yapılacak hızlı üreaz testi, histopatolojik yöntemle inceleme, kültür ve moleküler yöntemlerle araştırılması için gereklidir. Biyopsi örneğinin uygun şekilde alınması, taşınması ve saklanması oldukça önemlidir. Antrum bölgesinden (pilora 4 cm uzaklıkta) en az iki biyopsi örneği alınmalı, hastanın işlem öncesi simetidini alması ve 5–7 gün öncesinden antibiyotik alması kesilmeli, lokal anestezi için lidokainin seçilmeli, endoskopi işlemleri öncesi kullanılacak aletlerin önce uygun dezenfektanlar ile temizlenmelidir(28,29).

Dışkı örnekleri: Gastrik *Helicobacter*'lerin insan dışkı örneklerinden izole edilebilmesi oldukça güç olmaktadır. Dışkı örnekleri fekal antijen taranması, *H. pylori* DNA'sının araştırılması amacıyla kullanılabilir(29).

Kan ve serum örnekleri: *H. pylori*'nin, yüzeysel gastrik enfeksiyona neden olup invazyon yapmaması nedeniyle insan kan örneklerinden izolasyonu sık. Kan örnekleri ile

serolojik olarak *H. pylori* tanısına gidilebilmektedir. (derleme tanı 2007) Serum bakteriye özgül IgG ve IgA seviyelerini saptamak amacı ile kullanılabilir(29).

Non gastrik örnekler: *H. pylori*'nin varlığını araştırmak için dışkı harici nongastrik materyaller de kullanılabilir. Özellikle dental plak ve tükürükte *H. pylori*'nin genetik materyalinin aranması da mümkündür(29).

## 2.8.2. İnvaziv Yöntemler

Bu testler içinde endoskopik olarak alınan materyalin direk incelemesi, kültürü, histopatolojik incelemesi, PCR, üreaz testi yer almaktadır(25,28,29).

### 2.8.2.1. Direkt İnceleme

Biyopsi örneğinden lam üzerinde ezilerek hazırlanan yaymaların Gram yöntemiyle boyanarak incelenmesinden de başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Bu yöntem bir gece süren formalinde fiksasyonu gerektirmemekte ve biyopsi örneklerinin histopatolojik incelenmesinin daha hızlı olarak yapılmasını sağlamaktadır. Hazırlanan bu yaymalarda *H. pylori* ve *H. heilmannii* direkt olarak görülebilmektedir(1,2,6,28,29).

### 2.8.2.2. Kültür

*H. pylori*'nin tanısında kültür altın standarttır. Fakat duyarlılığı hem biyopsinin transport şartlarına hem de laboratuardaki çalışma şartlarına göre % 75-90 arasında değişmektedir. *H. pylori* kuruluğa ve çevre sıcaklığına duyarlı olup oda sıcaklığında canlılığını çabuk kaybetmektedir. Bakteriyolojik örneklerin çevre sıcaklığından korunması amacıyla uygun taşıma ortamına alınarak kısa sürede laboratuvara ulaştırılması ve laboratuvarında kısa süre içinde ekimlerinin yapılması gerekir. Bakteri dış şartlardan etkilendiğinde üretilmeyen kok-dormant formlara dönüşebilmektedir(2) Gliserol içeren ortamlar biyopsi örneklerinin hem transportu hem de daha uzun süre saklanmasına yardımcı olmaktadır. Suplement ilave edilmiş Beyin Kalp İnfüzyon broth ile de olumlu sonuçlar alınmaktadır. %20 glukozlu ve % 20 gliserol içeren Brucella broth transport ortamı olarak kullanılabilir. Laboratuvarında hazırlanan beyin kalp infüzyon broth (% 3,5), maya özütü (% 2,4), at serumu (% 5) ve Dents antibiyotik



suplamanti (vancomycin /trimetopurin /sefsolidin /amfoterisin) içeren besiyerleri hem transport hem de kültür için başarılı bir şekilde kullanılabilir(1,2,6,28,29). Örnek hemen ekilemeyecekse -70°C’de saklanabilir, ancak bu işlem kültürde üretmeyi %40 azaltmaktadır(28).

Biyopsi örnekleri ekim öncesinde homojenizasyon veya vorteksleme işlemine tabi tutulmalıdır. Materyal, taze hazırlanmış besiyeri ortamına; at kanı, at serumu veya koyun kanı ile zenginleştirilmiş Skirrow agar, beyin-kalp infüzyon agar, çikolatamsı agar, Brucella agar veya Columbia agar gibi besiyerlerine ekilmelidir. Ticari olarak elde edilen selektif besiyerleri, nazofaringeal ve diğer potansiyel kontaminantları baskılayabilir fakat bu besiyeri ile birlikte % 10 taze at kanı içeren Colombiya agara da ekim yapılması önerilmektedir. Ekim yapılan besiyerleri orta derecede nem, % 5–10 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C’lik ısı ortamında 5–7 gün süre ile inkübe edilmelidir. Yalancı negatif sonuç % 5-10 oranındadır. Anaerop kavanozda çeşitli ticari kitler kullanılarak mikroaerofilik ortam sağlanabilmektedir(1,2,6,28,29).

Kültür, selektif ve nonselektif besiyerleri kullanılarak mikroaerofilik atmosferde, 37 °C’de, 5-7 gün inkübasyonla gerçekleştirilmektedir. Koloniler 3-5 gün inkübasyon sonrası gözle görülebilir boyuta ulaşabilmekte, fakat primer izolasyonunda bu süre biraz daha uzayabilmektedir. Koloniler küçük, gri, şeffaf, hafif bombelidir ve bazen zayıf hemolitik aktivite gözlenebilmektedir. Bu bakterilerin gastrik biyopsi örneklerinden direkt yapılan Gram boyamada gözlemlenen morfolojileri ile kültürden hazırlanmış Gram boyamadaki görüntüleri arasında farklılıklar olabilmektedir. Kültürden izole edilen *H. pylori* kökenleri genellikle tipik görünümünün yanısıra düz basiller şeklinde de görünmekteyken, doku biyopsi örneklerinden yapılan boyamalarda genellikle tipik görünümü olan helikal ve daha kıvrımlı şekilde görünmektedir. *H. pylori*’nin kültürde varlığı konvansiyonel yöntemlerle; mikroskopik morfolojisine ek olarak incelenecek katalaz, oksidaz ve üreaz aktivitelerinin varlığı değerlendirilerek saptanmaktadır.(1,2,6,28,29). Kökenler -70°C’de skim-milk ya da %15-20 gliserol içeren BHI sıvı besiyerinde saklanabilmektedir(28).

Kültürün sağladığı en önemli avantajlardan biri de günümüzde giderek artan bir sorun olan antibiyotik direncini belirlemeye olanak sağlamasıdır. Uygulanacak antimikrobiyal duyarlılık testleri “The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” onaylı olan agar dilüsyon ve ülkemizde ve Avrupa ülkelerinde kullanılan E-

testtir. Bu testler rutin olarak uygulanmamalı, belirli aralıklarla antibiyotik duyarlılık paternini tanımlamak amacıyla yapılmalıdır(28).

Kültür aynı zamanda bakterinin patogenetik, virulans ve büyüme faktörlerinin, metabolik ürünlerinin araştırılmasına, aşı ve antijen hazırlanmasına, tiplendirmeye olanak sağlar(25,28,29).

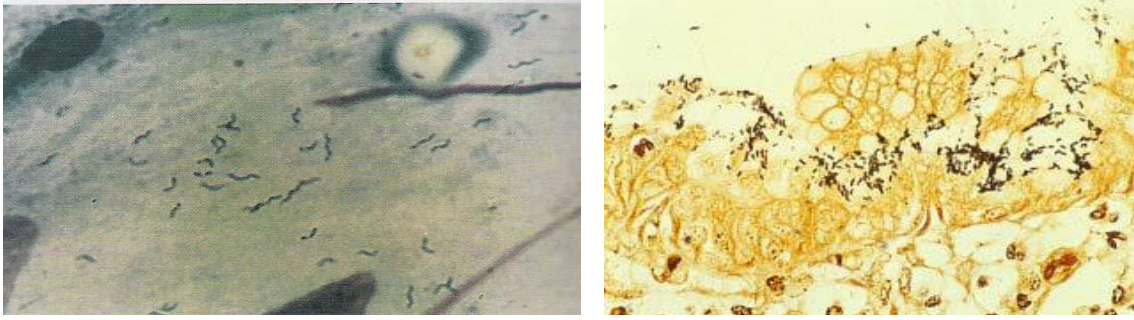
*H. pylori* güç üreyen bir bakteridir. Dışkı, diş plakları, tükürük, su ve gıda gibi örneklerdeki *H. pylori* kökenlerini üretmek imkansız derecede zordur. Bu amaçla antibiyotikli Wilkins–Chalgren agar kullanılabilmektedir. Ancak optimal şartlar sağlansa da izolasyon şansı % 10'u geçmez(2).

### 2.8.2.3. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik incelemelerin *H. pylori*'ye bağlı gastrik mukozadaki lezyonun sınıflanması ve tanımlanmasında, enflamasyonun ve varsa prekarsinojen değişimlerin şiddetinin belirlenmesinde önemli bir tanı yöntemidir(2,28,29). Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğü çeşitli faktörlerin etkisi altında olmakla beraber sırası ile < % 90 ve > % 95'dir. Bu oranlar biyopsi ve araştırmacıya ait faktörler tarafından değişmektedir. Muhtemel örnekleme hataları mikroorganizmanın farklı kolonizasyon yoğunluğuna bağlı olabilmektedir. Enfekte midede pilorun küçük kurvatüründen alınan örneklerde pozitif bulma şansı % 90'ın üzerine çıkmaktadır(2). Histopatolojik inceleme sonucu gastroduodenal patolojinin düzeyi ve premalign değişiklikler tesbit edilebilmektedir. Kronik gastrit veya peptik ülser şüphesi olan hastalarda, endoskopi ile dokudan alınan örneklerde *H. pylori* enfeksiyonu tanımlanabilmektedir(1,6,25,28,29,106).

Antrum ve korpustan alınan en az iki biyopsi örneği histopatolojik tanı ve organizmanın direkt taranması için sırasıyla formalinde fiksasyon, rutin hemotoksilen eozin boyaması ve özel boyama işlemlerine tabi tutulmalıdır. *H. pylori*, konvansiyonel hemotoksilen eozin boyası ile yüzey epiteline yapışık, mukus tabakasında ve sıklıkla kriptler içinde derinlerde bulunmaktadır. Gastrik mukozaya yapışık *H. pylori*'nin gösterilmesinde ise Giemsa ve Modifiye Steiner gümüş boyama yöntemleri gibi çeşitli özel boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Modifiye McMullen ve Gimenez gibi histokimyasal veya İmmün Floresan Antikor Testi ve İmmün Peroksidaz gibi immunohistokimyasal boyalar, Steiner silver boyası, Alcian blue ve hemotoksilen eozin boyasının birleşimini içeren duyarlı boyama teknikleri de geliştirilmiştir. Antral biyopsi

örneklerinin, rutinde kullanılan hematoksilin eozinle veya özgülüğün arttığı Warthin-Starry gümüşleme, akridin-oranj ve modifiye Giemsa ile boyandıktan sonra histopatolojik değerlendirilmesi oldukça iyi sonuçlar vermektedir(Şekil 2-5). Monoklonal veya poliklonal floresan anti-*H. pylori* antikörlerinin kullanıldığı immünohistokimyasal boyama tanıda özgül ve duyarlı bir yöntemdir, ancak maliyeti yüksektir(2,28,29)



**Şekil 2-5: Sırasıyla Giemsa ve Warthin-Starry gibi özel boyama teknikleriyle *H. pylori*'nin tespiti(156)**

#### 2.8.2.4. Hızlı Üreaz Testi

Endoskopi sırasında alınan antral biyopsi örneklerinden uygulanan *H. pylori* üreaz aktivitesinin tespiti prensibine dayalı hızlı üreaz testi hem ucuz hem de kolay bir tekniktir. Gastrik biyopsi dokusu üre içeren bir ortamda tutulacak olursa *H. pylori* tarafından üretilen üreaz üreyi kısa zamanda amonyak ve bikarbonata parçalamaktadır. Amonyak üretiminin sonucu olarak pH yükselmekte ve ortamdaki renk pembeye dönüşmekte ve dokuda bakterinin bulunduğu anlaşılmaktadır. Biyopsi örneklerinde üreaz aktivitesini araştırmak amacıyla çeşitli firmalarca üretilmiş gel test (CLO test, Hpfast), strip test (pyloriTek) ve tablet testler gibi hazır ticari kitler de mevcuttur. Hızlı üreaz testlerinin duyarlılığı mukozal biyopsi örneğindeki bakteri sayısının yanısıra incelenen biyopsi sayısına bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle duyarlılığı % 80-95, özgülüğü de % 95-100 civarındadır. Orofarenkste yerleşen ve üreaz üreten bazı kommensal bakteriler tükürükle gastrik biyopsi örneğini kontamine edebilmektedir. Ancak böyle zayıf enzimler midenin asidik lümeninde (pH<2) kolayca denatüre edileceklerinden testin özgülüğünü etkilememektedir(1,6,25,28,29).

Antibiyotik, bizmut içeren bileşikler ve proton pompa inhibitörleri gibi çeşitli ilaçların kullanılması bakteri miktarını geçici olarak azaltabileceğinden yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Hızlı üreaz testinde *H. pylori* yoğunluğunun az olduğu enfeksiyonlar atlanabileceğinden negatif bir test sonucu *H. pylori* enfeksiyonunun yokluğunu veya eradikasyonunu göstermek için yeterli değildir. Ticari kitlerle yapılan üreaz testleri ekonomik, yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle biyopsi dokusunda *H. pylori* enfeksiyonu tanısına yaklaşımda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu testlerle *H. pylori* enfeksiyonu, kullanılan kite göre değişmek üzere, 3-24 saatlik bir sürede taranabilmektedir. Pozitif sonuçların %90'ı ilk yarım saatte görülmekte ve geri kalanlarda ertesi gün okumayı gerektirmektedir.(25,28,29).

#### 2.8.2.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

Son yıllarda tanıda fenotipik tanı yöntemlerinin zaman alıcı olması, değişen oranlarda sensitivite ve spesivitelere sahip olması nedeniyle moleküler yöntemler kullanılmaktadır. *H. pylori* ve diğer *Helicobacter* türlerinin saptanmasında, enfeksiyonlarının tanısı, spesifik virulans faktörlerinin tayini, konakta ortaya çıkan cevabın genetik temeli ve antibiyotik direncinin belirlenmesi, eradikasyon tedavisinden sonra tekrarlayan enfeksiyonların nedeninin tespit edilmesi ve kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi amaçlar için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin özgün olarak taranmasında bakterinin 16S rRNA, 23S rRNA, random kromozom dizileri, 24 kDa tür spesifik protein kodlayan genler, 26 kDa tip spesifik antijen geni, üreaz A (ureA) geni, üreaz C (ureC) olarak adlandırılan fosfoglukozamin mutaz, glmM, ve vacA gibi farklı hedef genlerine yönelik PCR yöntemi kullanılmaktadır. Ancak bu testler tanı yöntemi olarak rutin uygulamalarda pek fazla tercih edilmemektedir. Uygulamadaki teknik zorluklar, inhibitörlerin varlığı nedeni ile yanlış negatif sonuçların alınabilmesi ve maddi açıdan ekonomik olmaması PCR uygulamalarında karşılaşılabilecek dezavantajlardır. PCR yönteminin avantajı ise tükürük, dışkı, gastrik sıvı, safra gibi içinde az sayıda bakteri bulunan klinik örneklerde mikroorganizma DNA'sını saptayarak noninvaziv *H. pylori* tanısı yapılabilmesidir. Moleküler yöntemler aynı zamanda antibiyotik direncine neden olabilecek mutasyonların tanınması, epidemiyolojik açıdan hastalığın yayılma yollarının araştırılmasında, *H. pylori* kökenleri arasındaki genetik farklılıkların saptanmasında ve

patojenitesinin araştırılmasında uygun olan yöntemlerdir. Antibiyotik alan hastalarda tedavi sonrası gastrik mukozadaki bakteri sayısı kültür ve diğer tanı yöntemleri ile tesbit edilemeyecek kadar az olabileceğinden tedavi başarısının takibinde PCR'nin tercih edilebilecek yöntem olduğu bildirilmektedir(1,6,25,28,29).

*H. pylori*'nin PCR ile taranmasında ve tanımlanmasında ureA, ureB, ureC, cagA, adhesin ve 23S rRNA geni gibi farklı gen dizileri kullanılabilir. Testin doğruluğunu etkileyen faktörler arasında primer ve hedef DNA bölgesi seçimi, örneğin hazırlanması, bakteri yoğunluğu, PCR uygulaması ile ilgili teknik konular yer almaktadır. Farklı hedef bölge ve primerlerin tercih edildiği değişik protokollerin uygulandığı PCR yöntemlerinde duyarlılık ve özgüllük değişmektedir(29).

### 2.8.3. İnvaziv Olmayan Yöntemler

İnvaziv olmayan yöntemler, endoskopik girişime gerek duyulmadan uygulanan testlerdir. Endoskopik testlerden daha ucuz ve daha kolay uygulanabilmektedirler. Bakterinin eradikasyon takibinde de kullanılabilir. Bu testler arasında, üre nefes testi, hasta serumunda antikor tayinine yönelik serolojik testler, dışkıda *H. pylori* antijenlerini tayin eden immunolojik testler, dışkı ve diş taşlarında nükleik asit dizilerini arayan PCR bazlı testler yer almaktadır(27).

#### 2.8.3.1. Üre Nefes Testi(ÜNT)

Endoskopi yapılmaksızın *H. pylori* enfeksiyonunun direkt taranmasını mümkün kılan ÜNT hem tedavi edilmemiş hastalarda aktif enfeksiyonun başlangıç tanısında, hem de tedaviden sonraki 6. haftadaki tedavinin etkinliğini takipte kullanılabilen nispeten pahalı duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek bir testtir. *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı için Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan bu testte iki tip karbon izotopu (Radyoaktif karbon <sup>14</sup>C karbon izotopu ve stabil, non-radyoaktif <sup>13</sup>C izotopu) kullanılabilir. Bu test, organizmanın CO<sub>2</sub>'i sindirilmiş üreden ayrıştıran üreaz aktivitesi esas alınarak hazırlanmış olup, işaretlenmiş ürenin hasta tarafından yutulması sonrası midedeki *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi tarafından oluşturulan izotop işaretli CO<sub>2</sub>'in kan akımına absorbe edilip dışarı atılan nefeste belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Sitrik asit içerisinde 75 mg <sup>14</sup>C veya <sup>13</sup>C ile

işaretli ürenin mideye alınmasından 30 dakika sonra solunum yoluyla dışarı verilen hava toplanmaktadır. İşaretli CO<sub>2</sub>'in değerlendirilmesi için <sup>13</sup>C işaretli CO<sub>2</sub> gaz izotopu oranı kitle spektrometresi ile ölçülürken, <sup>14</sup>C işaretli CO<sub>2</sub> radyoaktif ölçüm ile analiz edilebilmektedir. Radyoaktif içeriği dolayısıyla çocuk ve gebelerde kullanımı önerilmemekle birlikte non-invaziv testler içinde altın standarttır. Diğer yöntemlerde midenin *H. pylori* açısından incelenmesi örneğin alındığı bölge ile sınırlı iken, farklı olarak ÜNT'de genel bir değerlendirme sağlamaktadır. Fakat histoloji veya üreaz testi gibi ÜNT'de de yüksek yoğunlukta bakteri bulunması test için gereklidir. *H. pylori* sayısını belirlenebilecek eşiğin altındaki sayılara indiren herhangi bir ilaç (özellikle proton-pompası inhibitörleri, bizmut-içeren bileşikler veya antibiyotikler) kullanan hastalarda %40 oranında yalancı negatif sonuçlar verebilmektedir(25,28,29,106).

### 2.8.3.2. Serolojik Yöntemler

Serolojik yöntemler *H. pylori* tanısında kullanılan yaygın yöntemlerden biridir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır. *H. pylori* enfeksiyonu sonrası organizmada güçlü lokal ve sistemik humoral yanıt oluşmaktadır. Midede salgısal IgA düzeyleri, serumda ise bakteriye özgül IgG ve IgA seviyeleri yükselmektedir. Serolojik testler gerek toplum taramalarında gerekse *H. pylori* enfeksiyonlarının tanısında diğer tanı yöntemlerinden farklı olarak antibiyotik ve/veya antisekretuar tedaviden etkilenmediğinden, öncelikle kullanılabilir yöntemlerin olmasına karşın tedavinin etkinliğini izlemede kullanışlı değildir. Özgül IgM antikorlar kısa süreli olarak yükselmekte, IgG ve IgA enfeksiyon süresince artmakta ve tedavi edilmedikçe yüksek kalarak IgM'nin aksine yıllarca tesbit edilmektedir. Tedaviyi izleyen aylarda eradikasyon sağlandıysa IgG ve IgA düzeyleri düşmektedir. IgG düzeyi hiçbir zaman tamamen negatifleşmemektedir. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, tedavi öncesi ve tedavi bitiminden itibaren üç-altı ay sonra olacak şekilde iki titrasyonun karşılaştırılması gereklidir. Bu testlerde kullanılacak antijenler çok önemlidir. Genellikle üç tip antijen kullanılmaktadır; tam hücreler ve tam hücre parçaları gibi ham antijenler, glisin ekstraktları ve ısı değişken olmayan antijenler gibi hücre parçacıkları, üreaz ve 120 kDa antijen gibi zenginleştirilmiş antijenler. Anti-*H. pylori* serum IgG analizleri serum IgA'ya oranla daha fazla özgün ve duyarlı olup, serum düzeyi her zaman daha yüksek oranlardadır(28,29,157,158).

Serolojik testlerle serumda anti-*H. pylori* IgG'nin araştırılması için günümüzde en yaygın kullanılan yöntem ELISA olup bu amaçla çeşitli firmalarla üretilmiş ticari kitler mevcuttur. Bu yöntemde duyarlılık ve özgüllük yaklaşık % 95'ler civarındadır. Serolojik testler ekonomik olmasına karşın diğer noninvaziv yöntemlerden olan ÜNT ve dışkıda antijen aranmasına dayalı testlere oranla daha az güvenilirdir. Anti-*H. pylori* serum IgG sonuçlarındaki muhtemel yalancı negatiflik durumlarında serum IgA değerlerine bakılabilmektedir. Ayrıca muayenehanelerde kullanıma yönelik hazırlanmış, tam kan veya parmak ucu kan örneklerinin kullanıldığı 4-10 dakika gibi kısa sürede sonuçlanabilen kart testleri de mevcuttur. Bu hızlı immunolojik testlerin laboratuvar ortamında yapılan ELISA yöntemlerine oranla sensitivitesi daha düşüktür. Negatif çıkan yöntemlerin ELISA yöntemi veya ÜNT ile doğrulanması gerekir(28,29).

Son yıllarda virülans genlerini saptamaya yönelik serolojik kitler geliştirilmiştir. "Western Blot", immüno blotlama, bakterinin çeşitli bölümlerine karşı oluşan sıvısal bağışık yanıtı saptamada kullanılan oldukça duyarlı ve özgül bir yöntemdir(28,159).

### 2.8.3.3. Dışkıda Antijen Aranması

Dışkıdan *H. pylori*'nin kültür yöntemleri ile izolasyonu oldukça zordur. *H. pylori*'nin direkt fekal antijen taranması FDA tarafından tanı ve takip amacıyla onaylanmıştır. Bu yöntem ile tanı, özellikle pediatrik hastalar gibi üre solunum testinin uygulanmasının zor olduğu durumlarda ve antikor sonuçlarının daha az güvenilir olduğu (örneğin HIV-1 ile enfekte bireyler) olgularda, daha faydalıdır. Direk fekal antijen testi maddi açıdan da oldukça ekonomiktir. Yöntem taze dışkı örneklerindeki *H. pylori* antijenlerinin antikor emdirilmiş çukurcuklarda taranması esasına dayanmaktadır ve bu amaçla çeşitli firmalarca üretilen poliklonal ve monoklonal antikor kaplı kitler mevcuttur. Poliklonal antikorlu testlerin özgüllüğü oldukça yüksekken, duyarlılığı değişken olarak saptanmıştır. Monoklonal antikorlu testler yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermiştir. Yapılan çalışmalarda fekal antijen taranmasının hızlı, kolay uygulanabilen non invaziv *H. pylori* tarama testi olduğu ifade edilmiştir(28,29,142,160,161).

#### 2.8.3.4. Dışkıda DNA Aranması

Dışkı *H. pylori* DNA'sının araştırılabileceği materyallerden biridir. Dışkıda *H. pylori* tanısında NAAT kullanılacaksa, hedef gende mümkün olan en az iki set en kısa fragmenti tanıyan primerlerin seçilmesi önerilmiştir. Ayrıca, reamplifikasyon, nested PCR yöntemleri dışkıda *H. pylori* saptanmasında testin duyarlılığını arttırmaktadır. Dışkıdan *H. pylori* DNA'sının taranması esasına dayalı çalışmalarda başarı % 25 -100 arasında değişen oranlarda rapor edilmiştir. Bu değişiklikler muhtemelen *H. pylori*'nin gastrointestinal sistemin alt kısımlarına salınmasına ve buradaki inhibitörlerin varlığına bağlıdır. İnsan dışkısı DNA eldesini inhibe edecek kompleks polisakkaritler gibi inhibitörler içermektedir. Bakteri DNA'sının dışkıda aranması sırasında karşılaşılan inhibitörlerin olasılıkla diyetdeki sebzelerden kaynaklanan kompleks polisakkaritler olduğu belirtilmiştir.(28,29).

Dışkı filtrasyon yöntemi inhibitörlerin uzaklaştırılmasında kullanılan önemli bir yöntemdir. Bu amaçla polipropilen membran ile süzülen dışkı örneklerinde PCR inhibitörlerine rastlanmamıştır. İmmüno manyetik ayırma bir diğer inhibitör uzaklaştırma yöntemidir. *H. pylori* yüzey antijenlerine karşı antikolarla kaplı manyetik boncuklar kullanılmaktadır. Dışkıdaki *H. pylori* basil ve kok formları bu boncuklara yapışmakta, örnekteki inhibitörler ise yıkamayla uzaklaştırılmaktadır. Biyokimyasal saflaştırma ise dışkıdan DNA ekstraksiyonu için kullanılan bir başka yöntemdir(28).

Dışkı harici nongastrik materyallerden *H. pylori*'nin genetik materyalinin aranması da mümkündür. PCR ile dental plak ve özellikle tükürük kullanılarak bakteri DNA'sının aranması spesifik fakat duyarlılığı düşük bir yöntemdir(29).

#### 2.8.3.5. Tükürük ve İdrar Testleri

Ticari kitler kullanılarak idrar ve tükürükte anti-*H. pylori* IgG antikolarının saptandığı bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğü açısından diğer testlere göre zayıf olduğu bildirilmektedir(29).

### 2.9. *H. pylori* Enfeksiyonlarında Tedavi

Bakteri ile kolonize kişilerin tümünde gastrit gelişirken, sadece %20'sinde peptik ülser, mide kanseri ve MALT lenfoma gibi bir patoloji gelişmesi ve özellikle



gelişmemiş ülkelerde %80 gibi yüksek oranlara varan taşıyıcı kişilerin hepsinin tedavisinin olanak dışı olması gibi nedenlerle *H. pylori* pozitif tüm kişilerin tedavi edilmesine gerek yoktur. Sadece mideye ait yakınmalarla hekime başvuran hastalar tedavi edilmelidir. Asemptomatik kişilerin ise, ailesinde gastrik kanser öyküsü olanlar dışında tedavi edilmesi önerilmemektedir(25).

*H. pylori* ile ilişkisi kesin olarak kanıtlanmış hastalıklarda eradikasyon tedavisinin yapılması konusunda herhangi bir kuşku söz konusu değildir. Aktif *H. pylori* enfeksiyonu olan kişilerde mide asit sekresyonunu azaltan proton pompa inhibitörleri, antasit gibi ilaçların kullanımı, antrumdaki *H. pylori*'nin korpusa yer değiştirmesine veya daha önce korpusta lokalize olan enfeksiyonun ciddiyetinin artmasına, böylece kronik atrofik gastrit, mide kanseri riskinin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle uzun süre anti sekretuar ilaç alan kişilerde *H. pylori* eradikasyonu yapılmalıdır(25,27, 106,162).

Mide ülseri, duodenal ülser, endoskopik ve histopatolojik olarak kanıtlanmış atrofik gastrit, MALT lenfoma, mide kanseri veya başka nedenlerle mide ameliyatı olanlar, ailesinde mide kanseri öyküsü olanlar, gastro-özofageal reflü gibi uzun süre proton pompa inhibitörü alması gerekenler ve uzun süre nonsteroid anti-enflamatuvar ilaç alan hastalara *H. pylori* eradikasyonu yapılması gerekir(25,27,163).

Fonksiyonel dispepsili olgularda eradikasyon tedavisi konusunda kesin bir görüş birliği yoktur. Aslında en ideal yaklaşım, dispepsi yakınması olan kişilere üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılmasıdır. Ancak her hastada bu mümkün olmayacağı için hastanın yaşı ve herhangi bir organik hastalığın varlığını düşündürecek semptom ve bulgularının varlığına göre hastanın değerlendirilmesi ve izlenmesi önerilmektedir(25,164)

*H. pylori* enfeksiyonu ile GÖRH arasındaki ilişki halen tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar GÖRH ve onun komplikasyonları konusunda *H. pylori*'nin koruyucu rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Fakat diğerleri bu bulguları doğrulamamıştır. GÖRH için uzun süreli antisekretuar tedavi gerektiği zaman *H. pylori* eradikasyonu tavsiye edilmemektedir. Çünkü asit salgısının uzun süre baskı altına alınmasının, midenin fundus bölümünde *H. pylori* etkisiyle atrofik gastrit gelişmesini hızlandırdığı düşünülmektedir(106,165).

*H. pylori* enfeksiyonunun tedavisindeki amaç, mikroorganizmayı tamamen elimine etmektir. *H. pylori* enfeksiyonu için ideal tedavi, sürekli olarak  $\geq$  %95 gibi

yüksek şifa oranı olan ve hastalar tarafından iyi tolere edilen bir tedavidir. Ancak henüz böyle bir tedavi yoktur. *H. pylori* eradikasyonunda kullanılan tedavi ile en az %80-85 olguda eradikasyon sağlanmalıdır. Uygun ve etkili olmayan tedavi rejimleri *H. pylori*'nin direnç kazanmasına, sonuçta toplumda dirençli *H. pylori* kökenlerinin yayılmasına yol açmaktadır(106).

Günümüzde peptik ülser hastalarında *H. pylori*'nin uzun dönem eradikasyonu çeşitli antibiyotik kombinasyonları ile gerçekleştirilebilmektedir. Antisekretuar ilaçlara dirençli gastrik ve duodenal ülserde enfeksiyonun tedavisiyle ülserin iyileşmesi hızlanmakta, gastrik asit süpresyonuna gereksinimi azalmakta ve en önemlisi rekürrenslere ve ülser şikayetlerine karşı koruma sağlanmaktadır. *H. pylori*, başarılı bir şekilde eradike edildiğinde gastrik ve duodenal ülser rekürrensi 1 yıl içerisinde % 10'un altına düşmektedir(166).

*H. pylori*'nin gastrik mukoza ve mukus tabakasına benzersiz yerleşimi nedeniyle tedavisinde çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Birçok antibiyotik gastrik mukozadan çok zayıf sekrete edilmekte veya midenin asit pH'sında inaktive olmaktadır. Bu nedenle in-vitrodaki aktivite bazı durumlarda in-vivo'da görülmemektedir. Son 15 yıl boyunca antibiyotik, proton pompası inhibitörü (PPI) ve bizmut içeren çeşitli ilaçların birçok kombinasyonu denenmiştir. Birçok durumda da olduğu gibi ideal tedavinin, uygulaması kolay, ucuz, minimum yan etkiye ve yüksek eradikasyon oranına sahip olması beklenmektedir. Bu kriterlere dayanarak Maastricht 2-2000 konsensus raporunda antibiyotiklerle beraber PPI ve ranitidin bizmut sitratın kullanıldığı çeşitli kombinasyon tedavileri önerilmiştir(167). Bu tedavinin potansiyel yan etkileri ise mide bulantısı, ishal ve çeşitli tat anormallikleridir. *H. pylori* enfeksiyonunda ilk seçenek tedavi Maastricht-3 2005 uzlaşma raporuna göre halen; PPI + klaritromisin + amoksisilin ile kombinasyon içeren üçlü tedavidir(168). Birinci basamak bu tedavi rejimindeki eradikasyon oranlarının % 75-90 arasında değişmektedir. Tedavi başarısızlığındaki ana neden antibiyotik direncidir. Direnç oranları bölgelere göre çok farklılık göstermektedir. Bugün için ABD'de *H. pylori* kökenlerinin % 12'si klaritromisine dirençlidir. Bu Almanya'da % 9,8, İtalya'da % 26,7, ülkemizde % 25-40'lar düzeyindedir. Gelişmiş batı ülkelerinde metronidazole karşı *H. pylori*'deki mevcut direnç % 10-50 sıklığındadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran % 80-90'lara varmaktadır(106).

Şu anki etkin tedavi rejimlerine karşın hastaların % 10-20 sinde *H. pylori* eradikasyonu başarısız olmakta olup bakteri 4 hafta veya daha uzun bir süre pozitif

kalmaktadır. Başarısızlık genellikle bakteriyel direnç veya hastanın tedaviye zayıf uyumu nedeniyle olmaktadır. Eradikasyon oranlarının %80'nin altına düştüğü bölgelerde alternatif tedavi yaklaşımları önerilmektedir(106,169). Bunlar; tedavi süresinin uzatılması, dörtlü tedaviler, ardışık tedaviler, adjuvan tedavi, farklı antibiyotiklerin (furazolidon, tinidazol, levofloksasin) kullanıldığı tedavilerdir(106).

Tartışmaları halen devam eden üçlü tedavinin süresi konusunda bazı araştırmacılar 7-10 günlük bir süreyi uygun görürken, diğerleri en uygun sürenin 14 gün olduğunu kabul etmektedir. Üçlü tedavi iki hafta yapılırsa, eradikasyon oranı yedi günlük tedaviden %7-9 daha iyi olduğu bildirilmiştir(106,169,170).

Ardışık tedavi şemalarıyla (14 gün PPI, ilk yedi gün amoksisilin, 8-14. günlerde metronidazol, tetrasiklin) % 90'ın üstünde eradikasyon oranları gözlenmiştir. Klaritromisine dirençli hastalarda, ardışık tedavi ile % 90'ın üstünde bir eradikasyon sağlanılmıştır(106).

Adjuvan tedavi ile farklı antibiyotiklerle eradikasyon oranları artırılmaya çalışılmış, ancak umulan sonuçlar alınamamıştır. Bovine laktoferrinle yapılan adjuvan tedavide *H. pylori* koloni oranı azalmış fakat tam eradikasyon sağlanamamıştır. Farklı antibiyotiklerin (furazolidon, tinidazol, levofloksasin) bulunduğu protokoller genelde ikinci basamakta kullanılmaktadır, fakat eradikasyon oranı düştükçe bu antibiyotikler birinci basamak tedavide kullanılmaktadır (106).

Ranitidin bizmut sitrat içeren 3'lü tedavi ikincil tedavide bir başka alternatiftir. Ranitidin bizmut sitratla yapılan üçlü tedavilerde antibiyotik direnci daha az gelişmektedir. Klaritromisin direnci nedeniyle PPI ile üçlü tedavilerde eradikasyon sonuçlarının düşük olması sebebiyle ülkemizde ilk seçenek tedavinin ranitidin bizmut sitratlı üçlü tedavi olması ya da PPI, bizmut subsitrat, tetrasiklin ve metronidazol dörtlü kombinasyonu önerilmektedir. PPI, klaritromisin, metronidazol kombinasyonu, PPI, klaritromisin, amoksisilin kombinasyonuna göre daha iyi bir eradikasyon oranı sağlamaktadır. Ancak PPI, klaritromisin ve metronidazol tedavisi alan ve kür sağlanamayan hastalarda *H. pylori*'nin hem klaritromisine hem de metronidazole direnç kazanabileceğinin önemi hatırlanmalı ve kurtarma tedavilerinde seçeneklerin azaltılması için bu rejimin penisilin allerjisi olan ya da bizmut dörtlü tedaviyi tolere edemeyen olgulara saklanması önerilmektedir(106)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Alanı

Kasım 2011-Aralık 2012 tarihleri arasında kesitsel olarak planlanan çalışma, retrospektif kohort çalışması olarak yürütülmüştür. Bu tarihler arasında İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen 20954 nolu proje kapsamında çalışmaya dahil edilen İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne dispeptik şikayetlerle başvuran ve endoskopi endikasyonu olan 159 hastadan alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinden üretilen 51 *H. pylori* kökeninden prospektif randomize olarak seçilen 21 *H. pylori* kökeni tez projesi kapsamında çalışmaya alındı.

Araştırmanın laboratuvar çalışmalarından *H. pylori* kültürü ve stoklama işlemi İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda *H. pylori* üretimi ve tanımı için gerekli araç-gereçle donanmış bir bölümde, *H. pylori*'ye yönelik moleküler deneyler İntek A.Ş. AR-GE Laboratuvarı'nda, *H. pylori* ko-kültürü ve sitokin deneyleri ise İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Genetik Bölümü Laboratuvarı'nda deneylerin tüm çalışma aşamaları araştırmacı (R.Ç.A.) ve Danışman Öğretim Üyesi (B.K.) tarafından yürütüldü.

#### 3.2. Çalışma Planı

Çalışma planımız aşağıdaki aşamalar doğrultusunda yürütülmüştür.

1. Çalışma için gereken biyopsi örneklerinin alınımı sırasında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi'nde işleme nezaret edilerek, çalışma kriterlerimize uygun hastalardan alınan biyopsi örneklerinin uygun şartlarda fakültemizin mikrobiyoloji laboratuvarlarına zaman kaybetmeden taşınması sağlandı.

2. Çalışmaya alınan biyopsi örneklerinden *H. pylori* kültürleri yapıldı.

3. Üretilen *H. pylori* kökenleri

a. Stok yapılmak üzere çoğaltıldı ve çalışmanın diğer aşamaları için -80 °C'de saklandı.

b. Aynı zamanda kültürde üreyen *H. pylori* kökenlerinden PCR çalışmaları için ekstraksiyon yapılmak üzere örnekler hazırlandı.

4. Kültürde üreyen *H. pylori* kökenlerinden real-time PCR yöntemi ile *H. pylori* DNA varlığı araştırılarak doğrulandı.

5. *H. pylori* DNA'sı saptanan kökenlerden klasik PCR yöntemi ile *cagA*, *vacAs1/s2* allelleri, *vacAm1/m2* allelleri, ve *babA2* gen bölgeleri araştırıldı.

6. PCR deneyleri için pozitif kontrol olarak kullanmak üzere her bir gen bölgesinden dizi analizi yapılarak *H. pylori* RIGLD-HC139 kökeni ile karşılaştırıldı.

7. Farklı genotiplerin saptandığı *H. pylori* kökenlerinin THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleri ile ko-kültürü yapıldı.

8. Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenleri ile yapılan ko-kültürde THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtları araştırıldı.

### 3.3. Örnek Toplama Aşaması

#### 3.3.1. Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi'ne dispeptik şikayetlerle başvuran ve endoskopi endikasyonu olan hastalar arasından; 18 yaş ve üzeri olan, daha önce mide operasyonu geçirmemiş olan, *H. pylori* eradikasyon tedavisi almamış olan, son 2 hafta içerisinde herhangi bir antibiyotik ya da antisekretuar ilaç, bizmut tuzları veya sükralfat kullanmamış olan, kanama ve pıhtılaşma bozuklukları hikayesi olmayan hastalar çalışmaya dahil edildi.

### 3.3.2. Örneklerin Toplanması ve Laboratuvara Taşınması

Dispeptik şikayetlerle başvuran ve endoskopi endikasyonu olan hastaların midazolam kullanılarak bilinçli sedasyon altında üst gastrointestinal endoskopik incelemeleri yapılırken işleme nezaret edildi. Endoskopi sırasında iki antrum ve iki korpus biyopsi örneği alındı(29). Bir antrum, bir korpus biyopsi örneği histopatolojik tanı için 10 ml % 10 formalinde tespit edildi. Her bir antrum ve korpus biyopsi örneği ayrı ayrı 250 µl % 20 glukozlu Brucella Broth besiyerinde laboratuvara taşınarak 15 dakika içerisinde *H. pylori* kültürü için selektif besiyerine ekildi. Laboratuvarda biyopsi örnekleri antrum ve korpus kaynaklı olduğunu belirtecek şekilde numaralandırıldı ve kayıt altına alındı.

Çalışma protokolü, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu tarafından A-15 Karar No ile onaylandı ve tüm hastalar çalışmaya onam verdi.

### 3.4. *H. pylori* Kültürü Aşaması

#### 3.4.1. *H. Pylori* Kültürü İçin Kullanılan Besiyerleri ve Reaktifler

Kültürde başarının elde edilmesinde kullanılan besiyerlerinin, üreme için gerekli ortam koşullarının ideal olması yanısıra numunenin taşınmasının da bu başarıda büyük önemi vardır. Bu nedenle % 20 glukozlu Brucella Broth numune taşınması sırasında kullanıldı(2).

##### 3.4.1.1. Brucella Broth Besiyeri (%20 Glukozlu)

Brucella Broth.....	2,8 g
Glukoz.....	20 g
Distile Su.....	100 ml

Biyopsi örneklerinin laboratuvara taşınması amacı ile kullanıldı. 2,8 g toz Brucella Broth (BD BBL, USA) besiyeri 100 ml distile suda çözülüp 20 g glukoz (Merck, Almanya) ilave edildi. Otoklavda 105 °C'de 15 dakikada steril edilerek transport besiyeri hazırlandı ve 2-8 °C'de muhafaza edildi.

### 3.4.1.2. *Helicobacter* Agar Besiyeri

Agarlar petrilere dökülmüş kullanıma hazır biçimde Salubris A.Ş.'den temin edildi. *Helicobacter* Agar (Salubris, Türkiye) ürün içeriği şöyledir:

#### a. Brain Heart Infusion Agar ( Lab M, UK)

1 Litre İçin Kullanılan Dehidre Miktarı.....49 g

1 Litre İçin Kullanılan Dehidre İçeriği:

Agar No.2.....12 g

Brain heart infüzyon solid .....17,5 g

Triptoz.....10 g

Glukoz.....2 g

Sodyum klorid.....5 g

Disodyum hidrojen fosfat.....2,5 g

pH: 7,4±0,2

#### b. *Helicobacter pylori* Selective Supplement (Oxoid, UK)

1 Litre içerisinde kullanılan supplement miktarı.....2 şişe

1 şişe içeriği

Vankomisin.....5 mg

Trimetoprim.....2,5 mg

Sefsulodin.....2,5 mg

Amfoterisin B.....2,5 mg

#### c. % 6- 6,5 at kanı

### 3.4.1.3. Üre Agar Besiyeri

Üre agar.....24 g

Üre baz.....50 ml

Distile su.....950 ml

24 g üre agar (HiMedia, Çin) 950 ml distile suda eritilerek pH= 6.8'e ayarlandı. Agar solüsyonu 121°C'de 15 dakika tutularak steril edildi. Agar solüsyonu 50 - 55 °C'ye soğuyunca, steril şartlarda 50 ml üre baz (HiMedia, Çin) ilave edildi. İyiçe karıştırıldıktan sonra 4-5 ml miktarında tüplere dağıtıldı. Tüpler eğri pozisyonda bırakılarak katılaşmaları sağlandı. Üre agar besiyerindeki pembe renk değişikliği pozitif olarak değerlendirildi.

#### 3.4.1.4. Oksidaz Deneyi

Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür.....0,1 g  
Distile su.....10 ml

Oksidaz deneyi için, steril şişeler içinde % 1'lik tetrametil para fenilen diamin dihidroklorid (Fluka, Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonu hazırlandı. Steril plastik petri plağının tabanına filtre kağıdı yerleştirildi. Üzerine solüsyon damlatıldı. Plastik bir öze kullanılarak besiyerindeki kolonilerden biri alındı ve filtre kağıdına yayıldı. 10 sn içinde mavi-siyah renk gelişmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Test değerlendirilirken *P. aeruginosa* pozitif kontrol (mavi-siyah renk), *E.coli* ise negatif kontrol (renk değişmez) olarak kullanıldı

#### 3.4.1.5. Katalaz Deneyi

Kültürde üreyen kolonilerden bir tanesi dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir preparat üzerine transfer edildi. Üzerine bir damla % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Almanya) damlatıldı. Hidrojen peroksit damlatıldıktan hemen sonra baloncuk oluşumu varsa deney pozitif olarak değerlendirildi.

#### 3.4.2. *H. pylori* Kültürü

250 µl % 20 glukozlu Brucella Broth besiyerinde taşınarak laboratuvara getirilen antrum ve korpus biyopsi örnekleri homojenize edilerek Gram boyama ile inceleme için birer preparat hazırlandı ve *Helicobacter* agar besiyerine ayrı ayrı ekim yapıldı. Besiyerleri % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde (Sanyo, Panasonic, USA) mikroaerofilik ortamda, 37



$^{\circ}\text{C}$ 'de minimum 5-7 gün inkübe edildi. Bu süre zarfında besiyerinde üreyen bakterilerin koloni morfolojileri incelenerek şüpheli kolonilerden Gram boyama, üreaz, oksidaz ve katalaz deneyleri yapıldı.

Homojenize edilen antrum ve korpus biyopsilerinden hazırlanan preparatların Gram boyamasında virgül, martı veya spiraller şeklinde görülen Gram negatif çomaklar ve *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen şeffaf su damlası şeklindeki kolonilerden hazırlanan preparatların Gram boyamasında ise nispeten daha az kıvrımlı Gram negatif çomaklar şüpheli *H. pylori* olarak değerlendirildi. Bu kolonilerden yapılan üreaz, oksidaz ve katalaz deneyleri pozitif sonuç veren bakteriler *H. pylori* olarak tanımlandı.

### 3.4.3. *H. pylori* Kültüründen Stok Hazırlanması

Katı besiyerinde üremiş olan *H. pylori* kökenleri % 10 fetal bovine serumu içeren Brucella Broth besiyerine alınarak % 5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat tutulduktan sonra stoklama işlemine geçildi.

#### 3.4.3.1. Brucella Broth Besiyeri

Brucella Broth.....28 g

Distile su.....1000 ml

28 g toz Brucella Broth (BD BBL, USA) besiyeri 1000 ml distile suda çözülüp, otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakikada steril edildi. Bu besiyeri sıvı ortamda bakteri kültürü elde edilmesi için kullanıldı. Bu amaçla Brucella Broth besiyerine:

- Fetal bovine serumu (Lonza, USA) .....%10

- Vankomisin HCl (Sigma, Almanya) .....%0,01

ilave edilerek total hacim 20 ml'ye tamamlandı. *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kolonileri steril eküvyon ile toplanarak sıvı kültüre aktarıldı. Besiyerleri % 5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda bakterilerin hareketi ışık mikroskopunda x40 büyütmede kontrol edilerek üreyen sıvı kültürler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve supernatant atıldı.

### 3.4.3.2. *H. pylori*'nin Stoklanması için Brucella Broth Besiyeri (%20 Gliserollü)

Brucella Broth.....	14 g
Distile Su.....	400 ml
Gliserol.....	100 ml

14 g toz Brucella Broth 400 ml distile suda çözdürölüp 100 ml gliserol (Biomatik, USA) ilave edildi ve otoklavda 121 °C'de 15 dakikada steril edilerek stok besiyeri hazırlandı ve 2-8 °C'de saklandı.

Santrifüj aşamasını takiben tüplerde kalan pelletlere 1 ml stok besiyeri eklenerek ependorflara aktarıldı ve -80 °C'de saklandı.

### 3.4.4. *H. pylori* Kültüründen Ekstarksiyon İşlemi İçin Örnek Hazırlanması

Kültürde üreyen *H. pylori* kökenlerinden PCR deneyleri için kullanılmak üzere ependorflarda 1000 µl DNaz RNaz içermeyen su ile süspansiyon hale getirilerek deneyler yapılınca kadar -20 °C'de saklandı.

### 3.5. *H. pylori*'ye Dönük Moleküler Deney Aşamaları

*Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kökenlerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı ve bu ekstraktlar önce real-time PCR yöntemi kullanılarak *H. pylori* ureC gen bölgesinin tespiti yönünden incelendi. *H. pylori* ureC geni pozitif saptanan örneklerden klasik PCR yöntemi ile Tablo 3-1'de verilen spesifik primerler kullanılarak *H. pylori* cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2 allelleri, ve babA2 genlerinin tespiti yapılarak genotiplendirildi.

**Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve hedef gen uzunlukları(65)**

Primer	Dizi (5'-3')	Ürün uzunluğu(bp)
vacA s1/s2	Forward ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	259 (s1)/286 (s2)
	Reverse CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	
vacA m1/m2	Forward CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG	570 (m1)/645 (m2)
	Reverse GCG TCT AAA TAA TTC CAA GG	
cagA	Forward GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G	349
	Reverse CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A	
babA2	Forward AAT CCA AAA AGG AGA AAA AGT ATG AAA	832
	Reverse TGT TAG TGA TTT CGG TGT AGG ACA	

### 3.5.1. *H. pylori* DNA ekstraksiyonu

*H. pylori* bakteri DNA'sının ekstraksiyonu için Real Genomics Genomic DNA Extraction kiti (RBC Bioscience, Tayvan) kullanıldı. Ekstraksiyon üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1. Steril eppendorf tüpe konulan bakteri kültürü 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıp pellet kaydırılmadan supernatant atıldı.

2. 200 µl GT Buffer pelletin üstüne eklenip vortekslendi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

3. 200 µl GB Buffer tübe eklenip oluşan miks 5-10 saniye vortekslendi.

4. Tüpler 70 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. Daha sonra 200 µl % 96-100 Etanol eklenip vortekslendi.

6. Filtreli tübe aktarılan tüm içerik 13 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.

7. Filtreli tüp temiz olan bir eppendorf tüpüne aktararak üzerine 400 µl W1 Buffer eklenip 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, eppendorf tüp ile birlikte biriken lizat atıldı.

8. Temiz bir eppendorfa alınan filtreli tüpün üstüne 600 µl Wash Buffer (etanol eklenmiş) eklenip 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, eppendorf tüp ile birlikte biriken lizat atıldı.

9. Temiz bir ependorfa konulan filtreli tüp boş olarak maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi, ependorf tüp ile birlikte biriken lizat atıldı.

10. Temiz bir ependorfa alınan filtreli tüpe 100 µl Elution Buffer eklenip, 2 dakika bekletildi. Son olarak filtreli tüp ile birlikte 13 000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın ependorfa % 100 verimli olarak geçmesi sağlanıp, DNA izolasyonu tamamlanmış oldu.

### 3.5.2. *H. pylori ureC* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Ekstraksiyonu yapılan örneklerde *H. pylori* DNA'sını araştırmak amacıyla *H. pylori* - QLS 1.0 *H. pylori* DNA saptama Kiti (Fluorion, Türkiye) kullanılarak real-time PCR yöntemi uygulandı. *H. pylori* genomunun ureC geninin 156 bp'lik bölümü real-time PCR cihazında (FDS, Fluorion, Türkiye) çoğaltıldı (171). PCR ürünü, floresan bir boya olan SYBR-green aracılığıyla reaksiyon sırasında görüntülendi. Çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğu, erime eğrisi analizi yoluyla kesinleştirildi.

Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

dH<sub>2</sub>O

SYBR PCR Mix

Deteksiyon Mix 1

Pozitif Kontrol

MgCl<sub>2</sub>

Her bir örnek için reaksiyon Tablo 3-2' deki oranlarda hazırlandı.

**Tablo 3-2: *H. pylori ureC* gen bölgesinin tesbiti için kullanılan real-time PCR reaksiyonu hacimleri**

SYBR PCR Mix	12,5 µl
Deteksiyon Mix 1	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
Örnek DNA	10 µl
Toplam Hacim	26,5 µl

Pozitif kontrol olarak, kit içeriğinde bulunan pozitif kontrol kullanılırken, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. Amplifikasyon için örnekler real-time PCR cihazına yerleştirilerek *H. pylori* - QLS.tmo programı seçildi. Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

İlk denatürasyon	95°C	13:30 dk.	
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	} 50 döngü (Real-time veri toplama)
Primer bağlanma ve sentez	54°C	00:45 dk.	
Uzama	72°C	00:30 dk	
	60°C	01:00 dk	} 65 döngü (+0,5 °C/döngü) (Erime eğrisi analizi)
	60°C	00:15 dk	

*H. pylori* - QLS.tmo programı sona erdiğinde yazılımın otomatik olarak çizdiği eşik eğrisini kesen örnekler pozitif, bu çizginin altında kalan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi. Real-time analiz ekranında primer dimerleri yüzünden artış gösteren ve eşik çizgisini kesen örneklerin yanlış pozitif olarak değerlendirilmemeleri için erime eğrisi (melt curve) analizi yapıldı. *H. pylori* genomuna özgü çoğaltılan bölge erime eğrisi analizinde 75 °C'de ( $\pm 2$  °C) erime piki verdi. 75 °C'de pik vermeyen örnekler eşik çizgisini geçseler de negatif olarak değerlendirildi.

### 3.5.3. *H. pylori* Genotiplendirme Aşamaları

#### 3.5.3.1. *H. pylori* Genotiplendirme Aşamaları İçin Kullanılan Sarf Malzemelerinin ve Solüsyonların Hazırlanması

Moleküler testlerde kullanılmak üzere belirtilen solüsyonlar hem stok hem de günlük olarak hazırlandı. PCR işlemlerinde kullanılan master miks için:

a) HotStarTaq DNA Polimeraz(Qiagen,UK): HotStarTaq DNA Polimerazı *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş, *E. coli*'ye klonlanmış 94 kDa'luk rekombinant DNA polimerazın modifiye edilmiş bir formudur. Enzim reaksiyon öncesi inaktif bir formdadır. PCR reaksiyonunun başında 15 dakika 95 °C'de tutularak aktif hale gelmesi

sağlandı. Ayrıca PCR'in yüksek sıcaklık ile başlamasıyla hatalı bağlanan primerlerin ya da primer-dimerlerin önüne geçildi ve daha yüksek PCR spesifitesi ve kantitasyon hassasiyeti sağlandı.

b) QuantiTect Probe PCR Tamponu(Qiagen,UK): Tris-Cl, KCl,  $(NH_4)_2SO_4$ , 8 mM  $MgCl_2$  içerir, 20 °C'de pH 8,7' dir.

c) dNTP Karışımı(Qiagen,UK): Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP ve dTTP/dUTP içerir. Kullanılincaya kadar -20/-70 °C'de muhafaza edildi.

### 3.5.3.2. *H. pylori* cagA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

*H. pylori* cagA genini tesbit etmek amacıyla bu bölgeye spesifik 349 bp uzunluğundaki gen fragmanını hedef alan cagA F 5'- GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G ve cagA R 5'- CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A primerleri kullanıldı(65)(Tablo 3-1). Liyofilize halde gelen primerler ultrasaf su ile 100 pmol/ $\mu$ l olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Amplifikasyon karışımı Tablo 3-3' deki oranlarda hazırlandı. Pozitif kontrol olarak *H. pylori* cagA gen bölgesini içeren *H. pylori* kökeni kullanılırken, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

**Tablo 3-3: *H. pylori* cagA gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri**

PCR Miks	12,5 $\mu$ l
cagA_F (5 $\mu$ M)	3 $\mu$ l
cagA_R (5 $\mu$ M)	3 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3,5 $\mu$ l
Örnek DNA	3,0 $\mu$ l
Toplam Hacim	25,0 $\mu$ l

Amplifikasyon için örnekler termal cycler cihazına (Bio-Rad, Fransa) yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

İlk denatürasyon	95°C	15:00 dk.	
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	} 45 döngü
Primer bağlanma ve sentez	53°C	00:45 dk.	
Uzama	72°C	00:45 dk	
Final uzama	72°C	05:00 dk	

Amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek incelendi.

### 3.5.3.3. *H.pylori vacA s1/s2* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

*H. pylori vacAs1/s2* genini tesbit etmek amacıyla bu bölgeye spesifik 259 bp (s1) ve 286 (s2) bp uzunluğundaki gen fragmanını hedef alan *vacAs1/s2* F 5'-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC ve *vacAs1/s2* R 5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C primerleri kullanıldı(65)(Tablo 3-1). Liyofilize halde gelen primerler ultrasaf su ile 100 pmol/μl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Amplifikasyon karışımı Tablo 3-4'deki oranlarda hazırlandı. Pozitif kontrol olarak *H. pylori vacAs1/s2* gen bölgesini içeren *H. pylori* kökeni kullanılırken, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

**Tablo 3-4: *H. pylori vacAs1/s2* gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri**

PCR Miks	12,5 μl
<i>vacA s1/s2_F</i> (5μM)	3 μl
<i>vacA s1/s2_R</i> (5μM)	3 μl
dH <sub>2</sub> O	3,5 μl
Örnek DNA	3,0 μl
Toplam Hacim	25,0 μl

Amplifikasyon için örnekler termal cyclus cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

İlk denatürasyon	95°C	15:00 dk.	
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	} 45 döngü
Primer bağlanma ve sentez	52°C	00:45 dk.	
Uzama	72°C	00:45 dk	
Final uzama	72°C	05:00 dk	

Amplifiye olan *H. pylori* vacAs1 ve vacAs2 gen bölgeleri görüntülemek için % 12'lik poliakrilamid jelde yürütülerek incelendi.

#### 3.5.3.4. *H.pylori* vacA m1/m2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

*H. pylori* vacA m1/m2 genini tesbit etmek amacıyla bu bölgeye spesifik 570 (m1) ve 645 (m2)bp uzunluğundaki gen fragmanını hedef alan vacA m1/m2 F 5'-CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG ve vacA m1/m2 R 5'-GCG TCT AAA TAA TTC CAA GG primerleri kullanıldı(65)(Tablo 3-1). Liyofilize halde gelen primerler ultrasaf su ile 100 pmol/μl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Amplifikasyon karışımı Tablo 3-5'deki oranlarda hazırlandı. Pozitif kontrol olarak *H. pylori* vacAm1/m2 gen bölgesini içeren *H. pylori* kökeni kullanılırken, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

**Tablo 3-5: *H. pylori* vacAm1/m2 gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri**

PCR Miks	12,5 μl
vacA m1-m2_F (5μM)	3 μl
vacA m1-m2_R (5μM)	3 μl
dH <sub>2</sub> O	3,5 μl
Örnek DNA	3,0 μl
Toplam Hacim	25,0 μl



Amplifikasyon için örnekler termal cycler cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

İlk denatürasyon	95°C	15:00 dk.	
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	} 45 döngü
Primer bağlanma ve sentez	53°C	00:45 dk.	
Uzama	72°C	00:45 dk	
Final uzama	72°C	05:00 dk	

Amplifiye olan *H. pylori* vacAm1 ve m2 gen bölgelerinin elektroforezde ayırımını kolaylaştırmak için jel konsantrasyonu artırılarak % 3'e çıkarıldı ve elektroforez gerçekleştirildi.

### 3.5.3.5. *H.pylori* babA2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

*H. pylori* babA2 genini tesbit etmek amacıyla bu gene spesifik 832 bp uzunluğundaki gen fragmanını hedef alan babA2 F 5'- AAT CCA AAA AGG AGA AAA AGT ATG AAA ve babA2 R 5'- TGT TAG TGA TTT CGG TGT AGG ACA primerleri kullanıldı(65)(Tablo 3-1). Liyofilize halde gelen primerler ultrasaf su ile 100 pmol/μl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Amplifikasyon karışımı Tablo 3-6'daki oranlarda hazırlandı. Pozitif kontrol olarak *H. pylori* babA2 gen bölgesini içeren *H. pylori* kökeni kullanılırken, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

**Tablo 3-6: H. pylori babA2 gen bölgesinin tesbiti için kullanılan PCR reaksiyonu hacimleri**

PCR Miks	12,5 µl
babA2_F (5µM)	3 µl
babA2_R (5µM)	3 µl
dH <sub>2</sub> O	3,50 µl
Örnek DNA	3,0 µl
Toplam Hacim	25,0 µl

Amplifikasyon için örnekler termal cyclus cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

İlk denatürasyon	95°C	15:00 dk.	
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	} 45 döngü
Primer bağlanma ve sentez	55°C	00:45 dk.	
Uzama	72°C	00:45 dk	
Final uzama	72°C	05:00 dk	

Amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek incelendi.

### 3.5.3.6. Amplifiye Edilen Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi

#### A) 10X TBE (pH: 8.4) Solüsyonunun Hazırlanması

Tris-base.....	108 g
Borik asit.....	55 g
EDTA .....	8,3 g

Tris-base(MW: 121.14 g, Sigma, Almanya) 108 g, Borik asit(MW: 61,83 g Merck, Almanya) 55 g, EDTA (MW: 372,24 g, Ambresco, Kanada) 8.3 g tartılarak 1 litre distile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Oda ısısında muhafaza edildi.

## **B) AgaroZ Jel Hazırlanması**

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi için DNaz ve RNaz aktivitesi olmayan moleküler saflıkta agaroz (SeaKem<sup>R</sup>LE Agarose, Lonza, USA) kullanıldı.

Elektroforez tankının doldurulmasında ve jel hazırlanmasında 1X TBE solüsyonu pH 8,4 kullanıldı.

1. Hazırlanacak jel konsantrasyonuna göre tartılması gereken miktardaki agaroz tartılarak 1 XTBE solüsyonuna eklendi. (10 X TBE stok solüsyonundan 10 ml alınarak 90 ml distile su ile karıştırılarak 1X yoğunluğunda çözelti hazırlandı.)  
(% 2'lik agaroz jeli için: 2 g agaroz 100 ml 1 X TBE solüsyonuna eklendi.)  
(% 3'lik agaroz jeli için: 3 g agaroz 100 ml 1 X TBE solüsyonuna eklendi.)
2. Manyetik karıştırıcı yardımıyla 100-150 °C sıcaklıkta karıştırıldı.
3. Partiküller eriyip solüsyon homojen bir hale gelince, ısıtıcıdan indirildi.
4. El yakmayacak sıcaklığa gelinceye (yaklaşık 5-10 dakika) dek bekletildi. Bekleme sırasında çökeltilerin oluşmaması için birkaç kez sallanarak karıştırıldı.
5. Taraklar ve tabak temizlendi, jel dökme aparatı hazırlandı.
6. Hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilerek jel karışımı sabit hızda, ara vermeksizin, aparatın içine döküldü. Jel miktarı tabağın kenarındaki çizgiye dek (yaklaşık 30 ml) ayarlandı. Hava kabarcığı oluşursa mikropipet ucuyla patlatıldı.
7. Aparat kıpırdatılmadan 10 dakika boyunca jelin tamamen donması beklendi.
8. Taraklar çıkartıldı, jel, tabağıyla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi.
9. Jelin kurumaması için üzerini kaplayacak kadar 1 X TEB kondu.

## **C) Amplikonların AgaroZ Jele Yerleştirilmesi**

1. Parafilm üzerine 1,5 µl loading dye buffer (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) konuldu.

2. Üzerine 3 µl PCR ürünü ve 1,5 µl size marker ( Fermentas-100 bp, Thermo Fisher Scientific, USA) konuldu.

3. Örneklerin ve marker'ın üzerine 1,5 µl SYBRgreen I eklendi.
4. Mikropipet toplam hacme ayarlandı.
5. Örnekler mikropipetle bir iki defa karıştırıldıktan sonra alıp jele yüklendi.
6. Tankın güç kaynağı çalıştırılarak 80 mA – 120 V akım verildi, örnekler 40 dakika yürütüldü.

#### **D) Agoroz Jelin Görüntülenmesi**

Elektroforez sonrası jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (Biorad, USA, GelDoc cihazı, ve Quantity One programı) ile 312 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı altında görüntülenerek incelendi ve resimleri çekildi. Hedef bölge ile uyumlu amplikonlar pozitif olarak değerlendirildi.

#### **3.5.3.7. Amplifiye Edilen Ürünlerin % 12'lik Poliakrilamid Jel ile Görüntülünmesi**

##### **A) Gerekli olan malzemeler:**

1. % 30 Acrylamide ( 29 g Acrylamide + 1 g Bisacrylamide üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O konularak hazırlandı)
2. 5X TBE ( Tris - Borik Asit - EDTA )
3. % 10 APS (Ammoniumperoxodisulfat) ( Merck, Almanya) ( 0,1 g tartıldı ve dH<sub>2</sub>O ile 1 ml'ye tamamlandı)
- 4- TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin) (Merck, Almanya)
- 5- dH<sub>2</sub>O

##### **B) % 12'lik poliakrilamid jel hazırlanması:**

- % 30 Acrylamide	40 ml	} 6 ml + % 10 APS 85 µl + TEMED 5,5 µl
- 5X TBE	20 ml	
- dH <sub>2</sub> O	40 ml	

1. Yukarıda belirtilen oranlarda jel hazırlandı.
2. Daha önceden monte edilerek hazırlanmış elektorforez camlarına jel dökülerek tarak yerleştirildi ve jelin donması beklendi.
3. Jel donduktan sonra tarak çıkartıldı ve kuyucuklar alkol ve dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak jel artıklarından arındırıldı.
4. Jel elektroforez tankına yerleştirilerek 1X TBE buffer ile tank dolduruldu.
5. Örnekler ve marker yükleme tamponuyla (Bromfenol) karıştırılarak jele yüklendi.
6. Tankın güç kaynağı çalıştırılarak 150 V akım verildi ve örnekler 40 dakika yürütüldü.

#### **C) % 12'lik poliakrilamid jelin boyanması :**

1. Jel çıkartılarak derin bir kabın içine yerleştirildi.
2. Üzerine % 0,1 AgNO<sub>3</sub> konularak çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edildi.
3. Gümüş Nitrat çözeltisi tekrardan şişesine boşaltıldı. Jelin üzerine aşağıdaki solüsyon döküldü ve 1-2 dakika karıştırılarak bekletildi.

% 1,5 ' lik NaOH.....	100 ml
Formaldehit.....	400 ml
Sodyum Brohydride.....	% 0,04

En son aşamada jel su ile yıkandı ve su içerisinde 1-2 dakika bırakılarak asetat üzerine alındı. Hedef bölge ile uyumlu ampikonlar pozitif olarak değerlendirildi.

#### **3.5.3.8. Dizileme Reaksiyonu**

Örneklerimiz ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak İONTEK A.Ş.'de dizilendi. NCBI'de BLAST programı kullanılarak sonuçlar *H. pylori* genomu ile karşılaştırıldı ve uyumlu gen bölgelerini içeren kökenler PCR deneyleri için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### 3.6. Ko-Kültür Aşamaları

#### 3.6.1. Ko-kültür Yapılacak *H. pylori* Kökenlerinin Seçilmesi

Moleküler deneylerin sonuçlarına göre; *H. pylori* *cagA*, *vacAs1/s2*, *vacAm1/m2* alleleri ve *babA2* gen bölgelerini farklı kombinasyonlarda içeren *H. pylori* kökenleri farklı genotipler olarak belirlendi. Belirlenen farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin üretildikleri hastalara ait Sydney sınıflamasına göre değerlendirilen histopatolojik verilerine göre aktif ya da kronik gastrit varlığı, aktif ya da kronik gastritin şiddeti (hafif, orta şiddetli), lenfoid agregat, lenfoid folikül ve intestinal metaplazi varlığı açısından; her bir *H. pylori* genotipinin yol açtığı patolojilerde, ortak özellik gösteren aynı genotipteki *H. pylori* kökenlerinden biri hastaların başvuru sırasına göre ilk başvuranlar randomize olarak seçildi ve THP-1 (monosit) ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücre hattında ko-kültürü yapıldı ve bu hücrelerden proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 salınımı kantitatif olarak araştırıldı(172).

#### 3.6.2. Hücre Hattı

THP-1 hücre hattı(ATCC® TIB-202™)(173): Bu hücreler bir yaşında lösemi bir çocuktan elde edilen monosit benzeri hücrelerdir.

HL-60 hücre hattı(ATCC® CCL-240™)(174): Bu hücreler 36 yaşında akut promiyelositik lösemili bir kadından elde edilen promyeloblast hücrelerdir.

##### 3.6.2.1. THP-1 ve HL-60 Hücre Hattı Stoklarının Açılması

THP-1 ve HL-60 hücreleri -80 °C'de 9:1 oranında complete medium :DMSO içerisinde saklanmaktaydı. Complete mediumun içeriği;

L-Glutaminli RPMI 1640

% 10 Fetal Bovine Serum (FBS)

% 1 Penisilin/Streptomisin

Stokların açılmasında kullanılmak üzere toplam hacim 9 ml olacak şekilde RPMI complete medium (L-Glutaminli RPMI 1640 (Lonza, USA) + % 10 FBS (Lonza,

USA) + % 1 Penisilin/Streptomisin (Gibco, USA) hazırlandı. -80 °C'den alınan hücre stoğu 1 ml RPMI complete medium ile pipetlenerek çözüldü. Sonrasında 9 ml complete medium'a aktarıldı. Hücreler için toksik olan DMSO'dan arındırmak amacı ile 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice alınarak uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 5 ml taze RPMI complete medium içinde çözülerek T25 flaska aktarıldı. Hücrelerin miktarı ve canlılıkları mikroskopta kontrol edildikten sonra flask % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37 °C'de inkübe edildi.

### 3.6.2.2. THP-1 ve HL-60 Hücrelerinin 6-Well'e Aktarılması

Hücreleri 10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde 6-well'e aktarmak için stoklardan çoğaltılan T25 flastaki hücrelerden iyice pipetleme yaparak 1ml bir ependorfa alındı. Ependorfun içinden 10 µl alarak hemositometre yardımı ile hücreler sayıldı. 1 ml'de bulunan tüm hücrelerin sayısı hesaplandıktan sonra gereken hücre sayısına (6-well, 1x10<sup>6</sup> hücre/well = 6x10<sup>6</sup> hücre) ulaşmak için alınması gereken miktar hesaplandı. Gerekli miktar serolojik pipet yardımı ile alınıp 15 ml'lik bir falkona aktarıldı ve 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice pipetlenip atıldı. Pellet, % 10 FBS içeren 6 ml L-Glutaminli RPMI 1640 karışımında çözülüp 1'er ml her bir well'e dağıtılarak her well'de 1x10<sup>6</sup> hücre sayısına ulaşıldı. Mikroskopta canlılık ve yoğunlukları kontrol edilerek % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C'de deney süresince (24 saat) inkübe edildi. HL-60 hücreleri nötrofil farklılaşması için % 1,75 Dimethyl sulfoxide (DMSO) ile 5 gün inkübe edildi(175).

### 3.6.2.3. *H. pylori* Kökenlerinin Hazırlanması

*Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kolonileri steril eküvyon yardımı ile toplanarak % 10 FBS ve % 0,01 vankomisin içeren 10 ml Brucella Broth besiyerine ekim yapıldı ve % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda bakterilerin hareketi ışık mikroskobunda x40 büyütmede kontrol edilerek üreyen sıvı kültürlerden iyice pipetleme yaparak 1ml bir ependorfa alındı. Ependorfun içinden 10 µl alarak hemositometre yardımı ile bakteriler sayıldı. 1 ml'de bulunan tüm bakterilerin sayısı hesaplandıktan sonra hücre başına 1:20 MOI (multiplicity of infection) olacak şekilde alınması gereken miktar hesaplandı. Gerekli miktar serolojik pipet yardımı ile

alınıp 15 ml'lik bir falkona aktarıldı ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant atıldı. Pelletin üzerine % 10 FBS, % 10 Brucella Broth ve % 0,01 vankomisin içeren 4 ml L-Glutaminli RPMI 1640 eklenerek iyice pipetlendi ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ve supernatan atıldı. Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlanarak supernatan atıldı ve pelletin üzerine % 10 FBS, % 10 Brucella Broth ve % 0.01 vankomisin içeren 100 µl L-Glutaminli RPMI 1640 ilave edildi.

#### **3.6.2.4. *H. pylori* THP-1 ve Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücreleri ile Ko-Kültürü**

Her bir well'de % 10 FBS içeren 1 ml L-Glutaminli RPMI 1640'da 24 saat inkübe edilmiş olan THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerine, hücre başına 20 bakteri olacak şekilde hesaplanarak hazırlanan % 10 FBS, % 10 Brucella Broth ve % 0,01 vankomisin içeren 100 µl L-Glutaminli RPMI 1640'daki *H. pylori* ilave edildi. Kuyucuklarda % 10 FBS, % 10 Brucella Broth ve % 0.01 vankomisin içeren L-Glutaminli RPMI 1640 besiyeri toplam hacim 1,5 ml olacak şekilde tamamlandı. Hücrelerin bulunduğu kuyucuklardan birisine negatif kontrol olarak kullanmak üzere *H. pylori* ekimi yapılmadan yalnızca 500 µl % 10 FBS içeren L-Glutaminli RPMI 1640 ilave edildi. Ko-kültürler % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

Canlı bakteriler ile 24 saatlik inkübasyon sonrası % 10 FBS, % 10 Brucella Broth ve % 0.01 vankomisin içeren L-Glutaminli RPMI 1640 besiyerindeki hücreler kuyucuklardan bir kaç kez pipetlenerek 2 ml'lik ependorflara alındı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatanı toplandı ve 50 µl'lik hacimlerde alıkotlandı. Tüm deneyler, farklı tarihlerde olmak üzere iki kez tekrar edildi.

#### **3.7. Sitokin Yanıtının Saptanması**

*H. pylori* ile ko-kültürü yapılan THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α ve IL-10 düzeylerini kantitatif olarak ölçmek için BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD, USA) kullanıldı. Deneyler üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.



Standartların sulandırmak ve seri dilüe etmek için:

1. Liyofilize Human Inflammatory Cytokine Standard'ları 15 ml polipropilen tüpe aktarıldı ve "Top Standart " olarak etiketlendi.

2. Standartlar 2 ml Assay Diluent ile sulandırıldı. Sulandırılan standartlar 15 dakika oda ısısında tutuldu.

3. Sulandırılan standartlar vortekslenmeden yavaşça pipetlendi.

4. Sekiz adet tüp sırayla: 1:2, 1:4, 1:08, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 şeklinde etiketlendi. Her bir tüpe 300 µl Assay Diluent pipetlendi.

5. Seri dilüsyonlar şöyle oluşturuldu:

- a. 300 µl Top Standart 1:2 dilüsyon tüpüne yavaşça pipetlenerek iyice karıştırıldı.
- b. 1:2 dilüsyon tüpünden 1:4 dilüsyon tüpüne 300 µl aktararak, 1:256 dilüsyon tüpüne kadar, seri dilüsyon yapıldı.
- c. 0 pg/ml negatif kontrol için sadece Assay Diluent içeren tüp hazırlandı

Deney şu şekilde çalışıldı:

1. Mixed Capture Beads vortekslendi ve tüm deney tüplerine 50 µL eklendi.
2. Human Inflammatory Cytokine Standard'ları dilüsyonlarından standart tüplerine 50 µL eklendi.
3. Çalışılacak örnek tüplerine 50 µL supernatan eklendi.
4. Tüm deney tüplerine 50 µL Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent eklendi.
5. Deney tüpleri ışıktan korunarak 3 saat oda ısısında inkübe edildi.
6. Her bir deney tüpüne 1 ml Wash Buffer eklendi ve 5 dakika 200 g'de santrifüj edildi. Her bir deney tüpünden süpernatant dikkatlice pipetlenerek uzaklaştırıldı.
7. Her bir deney tüpüne 300 µL Wash Buffer eklenerek bead pellet resüspanse edildi.

8. Elde edilen örnekler BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD, USA) cihazında okutulmuş sonuçlar FCAP Array v3 software (BD, USA) kullanılarak analiz edildi ve farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenleri ile ko-kültürü yapılan THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve IL-10 düzeyleri kantitatif olarak tesbit edildi. Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenleri ile farklı tarihlerde 2 kez ko-kültürü yapılan THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve IL-10 düzeyleri 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalamaları alınarak değerlendirildi.

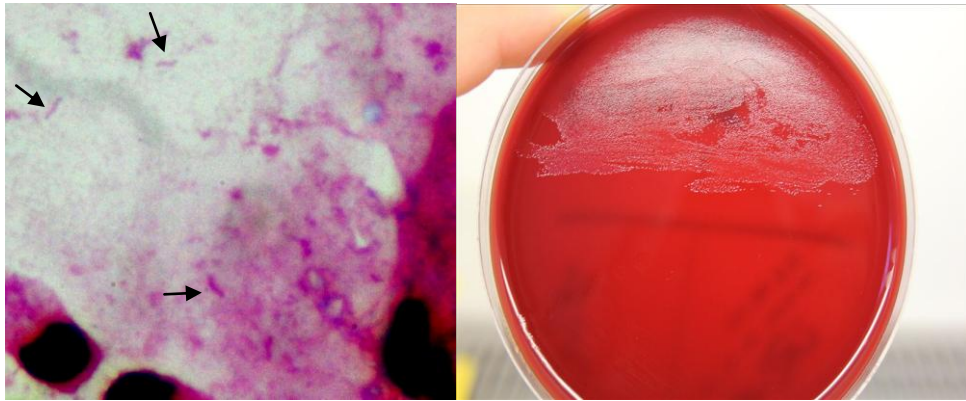
### **3.8. İstatistiksel Yöntemler**

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 21.0 istatistik programında değerlendirildi. Verilerin değerlendirilmesinde Student t test yöntemi kullanıldı.  $p < 0,05$  anlamlı değer olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamız; dispeptik şikayetleri ve endoskopi endikasyonu olan 159 hastadan alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinden üretilen 51 *H. pylori* kökeni arasından prospektif randomize olarak seçilen 21 *H. pylori* kökeni ile yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda endoskopi eşliğinde alınan mide antrum ve korpus biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatlarda Gram boyama ile hafif kıvrık Gram negatif çomaklar görülen ve biyopsi örneklerinin kültürü sonucunda *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* şüpheli kolonilerden(Şekil 4-1) hazırlanan preparatlarda Gram boyama ile görülen Gram negatif çomaklar ile birlikte kolonilerden yapılan üreaz, oksidaz ve katalaz deneyleri sonucunda pozitif saptanan 21 *H. pylori* kökeni çalışmaya alındı. Hasta grubunun demografik verileri, *H. pylori* kültürü, üreaz, oksidaz, katalaz deneylerinin sonuçları Tablo 4-1’de verilmiştir.



**Şekil 4-1: 1 numaralı hastaya ait biyopsi örneğinin Gram boyamasında *H. pylori*'nin mikroskopik görüntüsü (x100) ve *Helicobacter* agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kolonileri**

**Tablo 4-1: Hasta grubunun demografik verileri, *H. pylori* kültürü, üreaz, oksidaz, katalaz deneylerinin sonuçları**

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	H.pylori kültürü	Üreaz	Oksidaz	Katalaz
1	K	50	+	+	+	+
2	E	58	+	+	+	+
3	E	29	+	+	+	+
4	K	61	+	+	+	+
5	E	54	+	+	+	+
6	E	54	+	+	+	+
7	K	41	+	+	+	+
8	K	43	+	+	+	+
9	K	43	+	+	+	+
10	E	38	+	+	+	+
11	K	47	+	+	+	+
12	E	42	+	+	+	+
13	K	32	+	+	+	+
14	K	45	+	+	+	+
15	E	58	+	+	+	+
16	E	57	+	+	+	+
17	K	36	+	+	+	+
18	K	42	+	+	+	+
19	K	20	+	+	+	+
20	E	37	+	+	+	+
21	K	61	+	+	+	+

Hastalara ait demografik veriler ve diğer bulgular şöyledir:

Çalışmaya dahil edilen 21 hastadan oluşan grubumuzun % 57'si (12/21) kadın ve % 43'ü (9/21) erkekti, yaş aralıkları ise 20-61 arası olup yaş ortalamaları 45,14 idi.

Hastaların endoskopik muayenelerinde 19 (% 90) hasta non-ülser dispepsi tanısı alırken, 2 (% 10) hasta antral gastrit+bulbusta ülser tanısı aldı. Non-ülser dispepsili hastaların 13'ü (% 68) gastrit (antral gastrit veya pangastrit), 2'si (% 11) geçirilmiş ülser (gastrik ülser veya duodenal ülser), 1'i (% 5) GÖRH tanısına sahipken, 3'ünde (% 16) ise normal GİS endoskopisi izlendi. Hastalara ait *H. pylori* kültür sonuçları ve demografik verilerin endoskopik tanılarına göre dağılımı Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-2: Hastalara ait *H. pylori* kültür sonuçları ve demografik verilerin endoskopik tanılarına göre dağılımı**

<i>H. pylori</i> kültürü	Endoskopik Tanı					Toplam
	Gastrit+Ülser	Gastrit	Geçirilmiş Ülser	GÖRH*	Normal GİS	
Pozitif						
Kadın	0	9	1	0	2	12
Erkek	2	4	1	1	1	9
Toplam	2	13	2	1	3	21

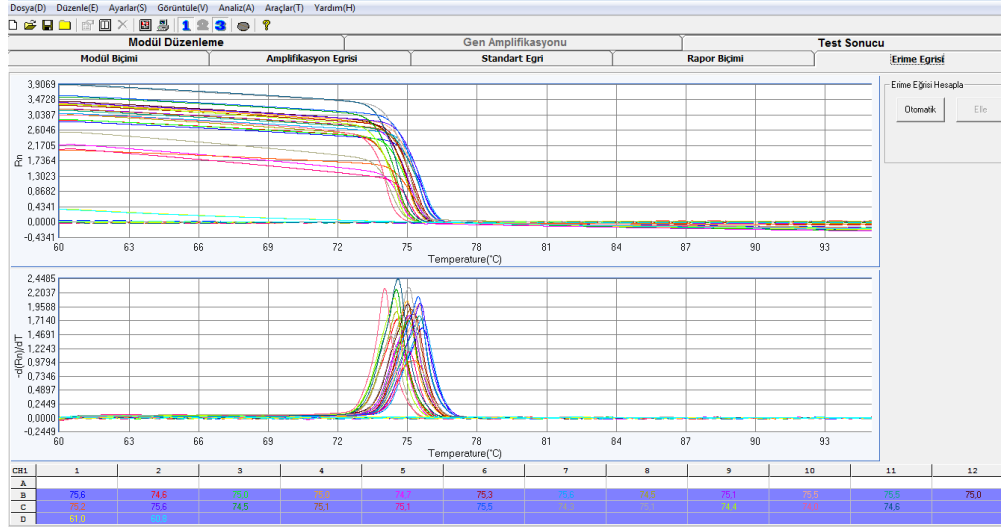
\*Gastroözefagial Reflü Hastalığı

#### 4.1. *H. pylori*'ye Dönük Moleküler Deney Sonuçları

*Helicobacter* agar besiyerinde üreyen kolonilerden real-time PCR yöntemi ile ureC genini hedefleyen *H. pylori* DNA varlığı tespit edildikten sonra *H. pylori* cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2 ve babA2 gen bölgeleri klasik PCR yöntemi ile araştırılarak çalışmaya alınan grupta *H. pylori*'nin farklı genotipleri saptandı.

##### 4.1.1. *H. pylori* ureC Gen Bölgesi

Kültürde üreyen kolonilerden *H. pylori* DNA varlığını tespit edebilmek için real-time PCR yöntemi ile *H. pylori* ureC geni araştırıldı ve % 100'ünde (21/21) deneyler pozitif saptandı. (Şekil 4-2)



**Şekil 4-2: Real-time PCR yöntemiyle erime eğrisi analizi ile *H. pylori* ureC gen bölgesine ait pozitif saptanan kökenlerin görüntüsü**

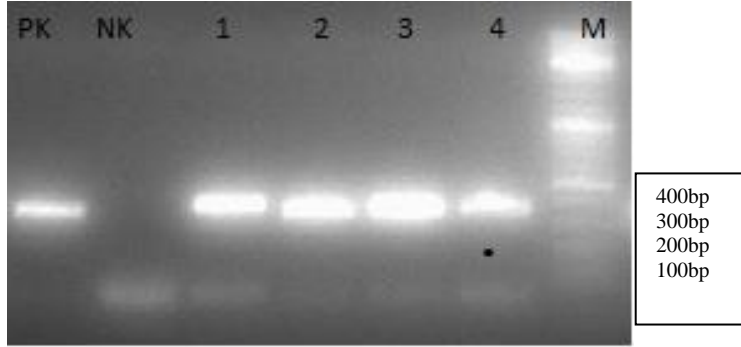
*H. pylori* DNA'sı saptanan kökenlerde *H. pylori* cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2, babA2 gen bölgelerinin sonuçları ve genotipleri Tablo 4-3'de verilmiştir.

**Tablo 4-3: *H. pylori* DNA'sı saptanan kökenlerde *H. pylori* cagA, vacAs1/s2, vacAm1/m2, babA2 gen bölgeleri sonuçları ve genotipleri**

	<i>H.pylori</i> DNA	cagA	vacAs1	vacAs2	vacAm1	vacAm2	babA2	Genotip
1	+	+	+	-	-	+	-	1
2	+	+	+	-	+	-	-	2
3	+	+	+	-	-	+	+	3
4	+	+	+	-	-	+	+	3
5	+	+	+	-	-	+	+	3
6	+	-	-	+	-	+	-	4
7	+	+	-	+	-	+	-	5
8	+	+	-	+	-	+	-	5
9	+	+	-	+	-	+	-	5
10	+	+	-	+	-	+	-	5
11	+	+	-	+	-	+	-	5
12	+	+	+	-	-	+	+	3
13	+	+	+	-	-	+	-	1
14	+	+	+	-	-	+	+	3
15	+	-	-	+	-	+	-	4
16	+	+	+	-	-	+	+	3
17	+	+	-	+	-	+	-	5
18	+	+	+	-	-	+	+	3
19	+	+	-	+	-	+	-	5
20	+	+	+	-	-	+	-	1
21	+	+	+	-	+	-	-	2

#### 4.1.2. *H. pylori* cagA Gen Bölgesi

Real-time PCR yöntemi ile ureC geni saptananak *H. pylori* olduğu belirlenen kökenlerin % 90,4'ünde (19/21) klasik PCR yöntemi ile *H. pylori* cagA geni tesbit edildi.(Şekil 4-3)(Tablo 4-3)



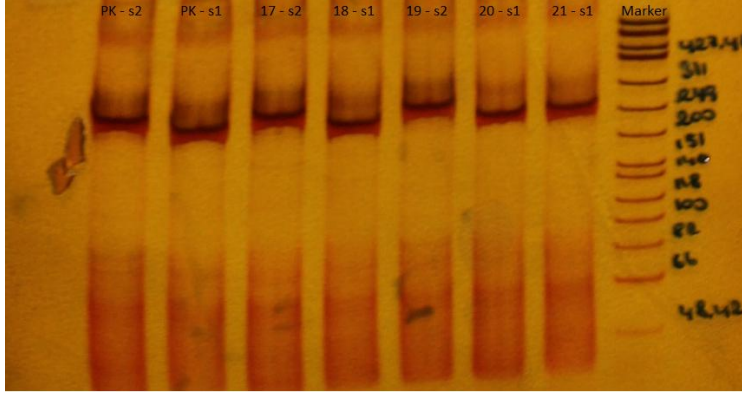
**Şekil 4-3: Klasik PCR yöntemi ile saptanan *H. pylori* cagA gen bölgesine ait agaroz jel görüntüsü**

\*PK: Pozitif Kontrol (349 bp), NK: Negatif Kontrol, 1: 1 numaralı hasta, 2: 2 numaralı hasta  
3: 3 numaralı hasta, 4: 4 numaralı hasta, M: Marker (100 bp)

#### 4.1.3. *H. pylori* vacA Gen Bölgesi

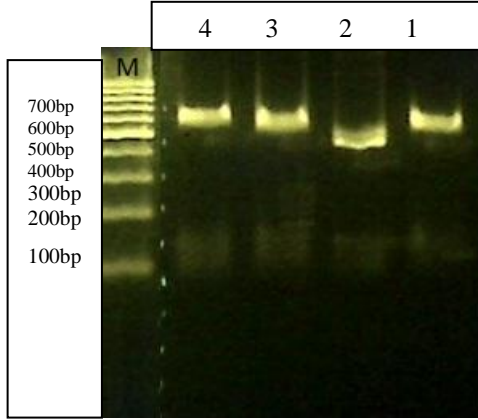
Real-time PCR yöntemi ile *H. pylori* ureC geni saptanan kökenlerde klasik PCR yöntemi ile *H. pylori* vacA s ve m gen bölgesi % 100'ünde (21/21) pozitif bulunurken, hastaların % 57,1'inde (12/21) vacAs1 ve % 42,9'unda (9/21) vacAs2 genini taşıdığı saptandı. (Şekil 4-4 ) *H. pylori* vacAm1 geni ise % 9,5 (2/21) oranındayken, vacAm2 oranı % 90,5 (19/21) olarak tesbit edildi.(Şekil 4-5 ) (Tablo 4-3).





**Şekil 4-4: Klasik PCR yöntemi ile saptanan *H. pylori* vacAs1/s2 gen bölgelerine ait PAG görüntüsü**

\* PK-s2: *H. pylori* vacAs2 Pozitif Kontrol (286 bp), PK-s1: *H. pylori* vacAs1 Pozitif Kontrol (259 bp), 17: 17 numaralı hasta, 18: 18 numaralı hasta, 19: 19 numaralı hasta, 20: 20 numaralı hasta, 21: 21 numaralı hasta



**Şekil 4-5: Klasik PCR yöntemi ile saptanan *H. pylori* vacAm1/m2 gen bölgelerine ait agaroz jel görüntüsü**

\*1: 1 numaralı hasta *H. pylori* vacAm2 (645 bp), 2: 2 numaralı hasta *H. pylori* vacAm1 (570 bp), 3: 3 numaralı hasta *H. pylori* vacAm2 (645 bp), 4: 4 numaralı hasta *H. pylori* vacAm2 (645 bp), M: Marker

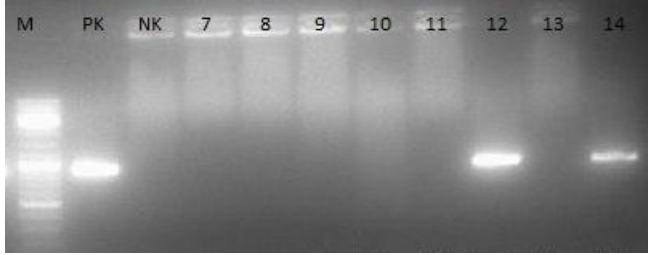
*H. pylori* vacAs1/s2 ve vacAm1/m2 allelerinin kombinasyonlarına bakıldığında; vacAs1m1 % 9,5'inde (2/21), vacAs1m2 % 47,6'sında (10/21), vacAs2m2 % 42,9'unda (9/21) oranında bulunurken vacAs2m1 alleli ise saptanmadı. Kültürde üreyen *H. pylori* kökenlerinin *H. pylori* vacA s1/s2 ve vacAm1/m2 allellerinin dağılımı Tablo 4-4'de verilmiştir.

**Tablo 4-4: Kültürde üreyen *H. pylori* kökenlerinin *H. pylori vacA* s1/s2 ve *vacAm1/m2* allellerinin dağılımı**

<i>H. pylori vacA</i>	s1	s2	Toplam
m1	2	0	2
m2	10	9	19
Toplam	12	9	21

#### 4.1.4. *H. pylori* babA2 Gen Bölgesi

Real-time PCR yöntemi ile *H. pylori ureC* geni saptanan kökenlerin klasik PCR yöntemi ile % 33,4'ünün (7/21) *H. pylori* babA2 genini taşıdığı tesbit edildi.(Şekil 4-6)(Tablo 4-3)



**Şekil 4-6: Klasik PCR yöntemi ile saptanan *H. pylori* babA2 gen bölgesine ait agaroz jel görüntüsü**

\*M: Marker (100 bp), PK: Pozitif Kontrol (832 bp), NK: Negatif Kontrol, 7: 7 numaralı hasta, 8: 8 numaralı hasta, 9: 9 numaralı hasta, 10: 10 numaralı hasta, 11: 11 numaralı hasta, 12: 12 numaralı hasta, 13: 13 numaralı hasta, 14: 14 numaralı hasta

#### 4.1.5. *H. pylori* cagA, vacA ve babA2 Gen Bölgelerinin Birliktelikleri

*H. pylori* kökenlerinde *cagA* geni ile *H. pylori vacA* allelleri birlikteliğine bakıldığında; *cagA* gen bölgesi *vacAs1* ile 12 (% 63,2) hastada, *vacAs2* ile 7 (% 36,8) hastada, *vacAm1* ile 2 (% 10,5) hastada, *vacAm2* ile 17 (% 89,5) hastada beraber saptandı. *H. pylori cagA* ve *vacA* gen bölgelerinin birlikte dağılımı Tablo 4-5'de verilmiştir.

**Tablo 4-5: *H. pylori* cagA ve vacA gen bölgelerinin birlikte dağılımı**

<i>H. pylori</i>	cagA
vacA	
s1	12
s2	7
Toplam	19
vacA	
m1	2
m2	17
Toplam	19

*H. pylori* cagA gen bölgesinin *H. pylori* babA2 gen bölgesi ile birlikteliğine bakıldığında; 7 (% 36,8) hastada babA2 geni ile beraber saptanırken, 12 (% 63,2) hastada ise babA2 geni negatif saptandı. *H. pylori* cagA ve babA2 gen bölgelerinin birlikte dağılımı Tablo 4-6’da verilmiştir.

**Tablo 4-6: *H. pylori* cagA ve babA2 gen bölgelerinin birlikte dağılımı**

<i>H. pylori</i>	cagA Pozitif	cagA Negatif	Toplam
babA2			
Pozitif	7	0	7
Negatif	12	2	14
Toplam	19	2	21

*H. pylori* kökenlerinde saptanan babA2 gen bölgesinin *H. pylori* vacA allelleri ile beraberliği değerlendirildiğinde ise; babA2 ve vacAs1 birlikte pozitifliği 7 (% 100) hastada, babA2 ve vacAm2 birlikte pozitifliği yine 7 (% 100) hastada saptanırken, babA2/vacAs2 ve babA2/vacAm1 birlikte pozitifliği saptanmadı. *H. pylori* babA2 ve vacA gen bölgelerinin birlikte dağılımı Tablo 4-7’de verilmiştir.

**Tablo 4-7: *H. pylori* babA2 ve vacA gen bölgelerinin birlikte dağılımı**

<i>H. pylori</i>	babA2
vacA	
s1	7
s2	0
Toplam	7
vacA	
m1	0
m2	7
Toplam	7

Deney sonuçlarına göre; 2 (% 9,5) hastanın *H. pylori* cagA ve *H. pylori* babA2 gen bölgelerinden her iki gen bölgesini de taşımadığı yalnızca *H. pylori* vacAs2m2 gen bölgesini taşıdığı tesbit edildi. *H. pylori* cagA ve babA2 gen bölgelerinin vacA s1/s2 ve m1/m2 allellere göre dağılımı Tablo 4-8’de verilmiştir.

**Tablo 4-8: *H. pylori* cagA ve babA2 gen bölgelerinin *H. pylori* vacA s1/s2 ve m1/m2 allellere göre dağılımı**

<i>H. pylori</i>	cagA	babA2
vacA		
s1	12	7
s2	7	0
Toplam	19	7
vacA		
m1	2	0
m2	17	7
Toplam	19	7

#### 4.1.6. *H. pylori* Kökenlerinin Genotipleri

*H. pylori* *cagA*, *vacAs1/s2*, *vacAm1/m2* ve *babA2* gen bölgelerinin tesbitine yönelik yapılan PCR deneylerinin sonuçlarına göre 5 farklı genotip tesbit edildi. Genotipler sırasıyla şöyledir:

1. genotip: *H. pylori* *cagA* ve *vacAs1m2* geni taşıyan kökenler
2. genotip: *H. pylori* *cagA* ve *vacAs1m1* geni taşıyan kökenler
3. genotip: *H. pylori* *cagA*, *vacAs1m2* ve *babA2* geni taşıyan kökenler
4. genotip: *H. pylori* *vacAs2m2* geni taşıyan kökenler
5. genotip: *H. pylori* *cagA* ve *vacAs2m2* geni taşıyan kökenler

Saptanan *H. pylori* genotiplerinin içerdikleri gen bölgeleri Tablo 4-9'da verilmiştir.

**Tablo 4-9: *H. pylori* genotiplerinin içerdikleri gen bölgeleri**

<i>H. pylori</i>	<i>cagA</i>	<i>vacAs1</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>	<i>babA2</i>
1. Genotip	+	+	-	-	+	-
2. Genotip	+	+	-	+	-	-
3. Genotip	+	+	-	-	+	+
4. Genotip	-	-	+	-	+	-
5. Genotip	+	-	+	-	+	-

Çalışmaya alınan 21 *H. pylori* kökeninin genotip dağılımı incelendiğinde; 1. genotip % 14,2'sinde (3/21), 2. genotip % 9,5'inde (2/21), 3. genotip % 33,4'ünde (7/21), 4. genotip % 9,5'inde (2/21) ve 5. genotip % 33,4'ünde (7/21) bulundu. *H. pylori* genotiplerinin dağılımı Tablo 4-10'da verilmiştir.

**Tablo 4-10: *H. pylori* genotiplerinin dağılımı**

Genotip	n(%)
1. Genotip	3 (%14,2)
2. Genotip	2(%9,5)
3. Genotip	7(%33,4)
4. Genotip	2(%9,5)
5. Genotip	7(%33,4)
Toplam	21(%100)

#### 4.2. Ko-Kültür ve Sitokin Yanıtı Sonuçları

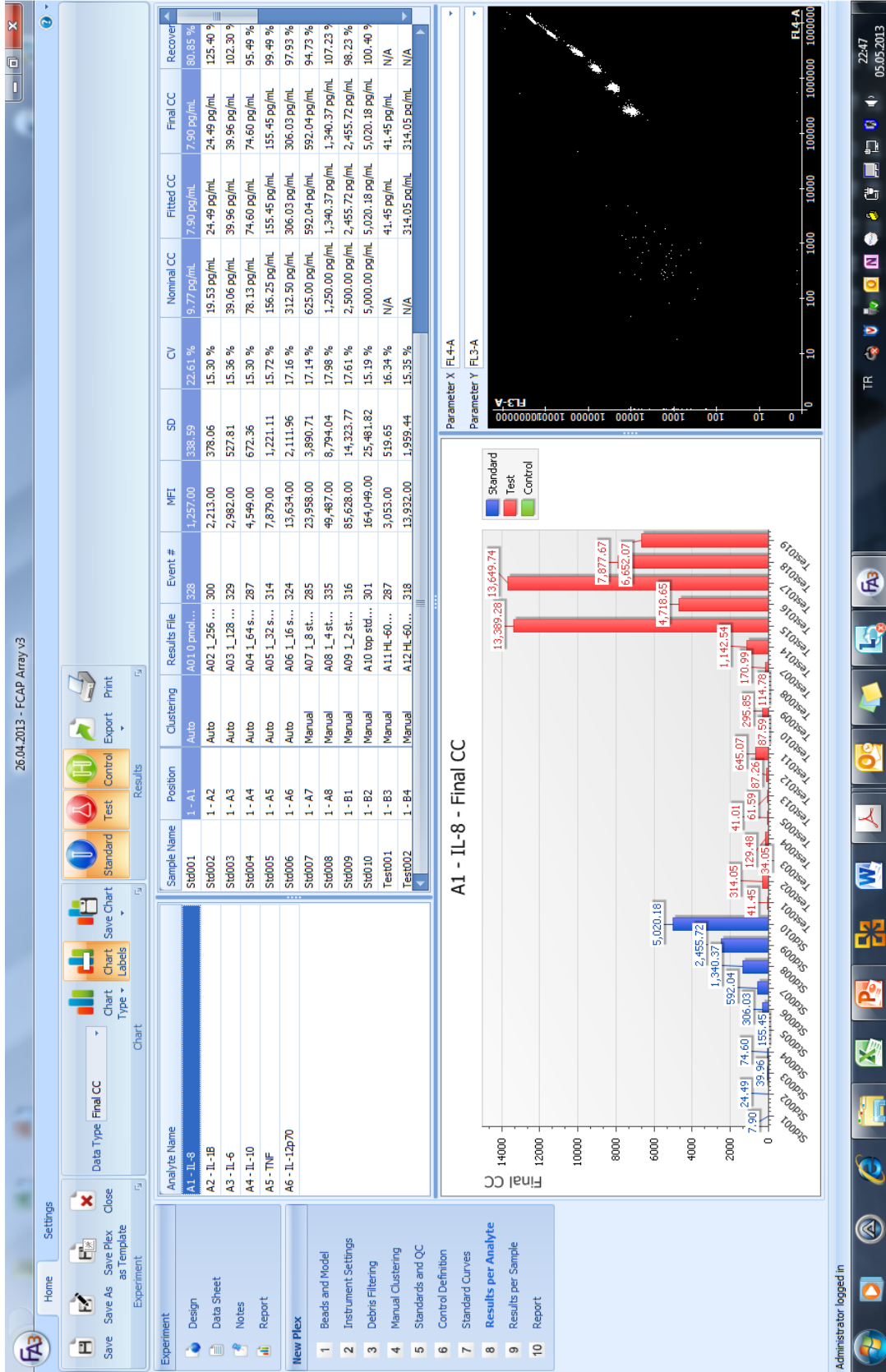
*H. pylori* *cagA*, *vacAs1/s2*, *vacAm1/m2* ve *babA2* gen bölgelerinin varlıklarına göre 5 farklı genotip olarak sınıflandırılan *H. pylori* kökenleri arasından her genotip için bir *H. pylori* kökeni randomize olarak seçildi ve THP-1 (monosit) ve HL-60 (nötrofil) hücre hattında ko-kültürü yapıldı. Ko-kültür için seçilen hastaların genotipleri, hasta numaraları, endoskopik tanıları ve histopatolojik verileri Tablo 4-11’de verilmiştir.

**Tablo 4-11: Ko-kültür için seçilen hastaların *H. pylori* genotipleri, hasta numaraları, endoskopik tanıları ve patolojik verileri**

Genotip	Hasta No*	Endoskopik tanı	Patolojik tanı	Modifiye Giemsa ile <i>H. pylori</i> yoğunluğu
1. genotip	1	Normal GİS endoskopisi	Korpus: İnaktif hafif derecede kronik gastrit. Antrum: Hafif derecede aktif, hafif derecede kronik gastrit.-Lenfoid agregat varlığı	Orta yoğunlukta <i>H. pylori</i>
2. genotip	2	Geçirilmiş ülser	Korpus: Hafif- orta derecede aktif orta derecede kronik gastrit. Lamina propriada orta derecede eozinofil artışı. PAS-AB boyası ile foveolar mukozada fokal komplet tip intestinal metaplazi	Orta yoğunlukta <i>H. pylori</i>
3. genotip	3	GÖRH	Korpus: İnaktif hafif derecede kronik gastrit. Antrum: Şiddetli derecede aktif orta derecede kronik gastrit.İntestinal metaplazi (Komplet tip).Lenfoid agregat varlığı	Yoğun <i>H. pylori</i>
4. genotip	6	Gastrit+ülser	Antrum mukozası: şiddetli aktif, orta derecede kronik gastrit, lenfoid folikül varlığı	Yoğun <i>H. pylori</i>
5. genotip	7	Gastrit	Oksintik mide mukozası: Hafif derecede aktif, hafif derecede kronik gastrit. Antrum mukozası: Şiddetli aktif, orta derecede kronik gastrit	Yoğun <i>H. pylori</i>

\* Tablo 4-1'deki sıralama ile verilen hasta numaraları

Tablo 4-11'deki verilere göre seçilen farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleri ile ko-kültürü sonucunda hücrelerden salınan proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 düzeylerinin FCAP Array v3 software ile analizi Şekil 4-7'de verilmiştir.



Şekil 4-7: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleri ile ko-kültürü sonucunda salgılanan sitokinlerin sonuçlarının FCAP Array v3 software ile analizi

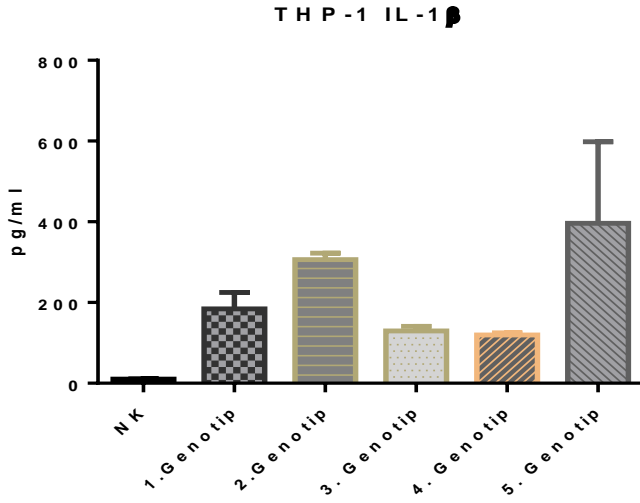


#### 4.2.1. THP-1 Hücresinde IL-1 $\beta$ Yanıtı

*H. pylori* farklı genotipleri ile ko-kültürü yapılan THP-1 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 184,5 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 306 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 129,5 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 119,5 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 396 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 10,15 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için THP-1 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  düzeyi incelendiğinde; IL-1 $\beta$  düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,001$ ). *H. pylori* genotipleri IL-1 $\beta$  salınımı yönünden irdelendiğinde; en fazla salınımın 5. genotipte olduğu belirlendi. (Şekil 4-8) *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-1 $\beta$  düzeyleri Tablo 4-12’de verilmiştir.

**Tablo 4-12: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-1 $\beta$  düzeyleri**

THP-1 IL-1 $\beta$	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	9,3	11	10,15	-	-
1. Genotip	144	225	184,5	49,25	< 0,001
2. Genotip	322	290	306	83,57	< 0,001
3. Genotip	141	118	129,5	33,71	< 0,001
4. Genotip	125	114	119,5	30,88	< 0,001
5. Genotip	194	598	396	108,99	< 0,001



**Şekil 4-8: *H. pylori* genotiplerine göre THP-1 hücresinden salınan IL- $\beta$  düzeyleri**

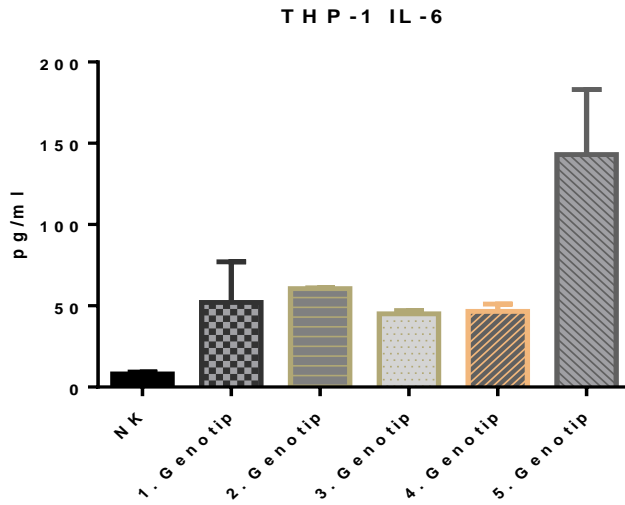
\*NK: Negatif Kontrol

#### 4.2.2. THP-1 Hücresinde IL-6 Yanıtı

Beş farklı genotipteki *H. pylori* kökenleri ile ko-kültürü yapılan THP-1 hücresinden salınan IL-6 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 52 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 60,5 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 45 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 46,5 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 143 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücresinden salınan IL-6 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 8,1 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için THP-1 hücresinden salınan IL-6 düzeyi incelendiğinde; IL-6 düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,001$ ). *H. pylori* genotipleri IL-6 salınımı yönünden irdelendiğinde; en fazla salınımın 5. genotipte olduğu belirlendi. (Şekil 4-9) *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-6 düzeyleri Tablo 4-13'de verilmiştir.

**Tablo 4-13: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-6 düzeyleri**

THP-1 IL-6	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	P değeri
Negatif Kontrol	9,2	7	8,1	-	-
1. Genotip	27	77	52	15,51	< 0,001
2. Genotip	60	61	60,5	18,51	< 0,001
3. Genotip	43	47	45	13,03	< 0,001
4. Genotip	51	42	46,5	13,56	< 0,001
5. Genotip	183	103	143	47,66	< 0,001



**Şekil 4-9: *H. pylori* genotiplerine göre THP-1 hücresinden salınan IL-6 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

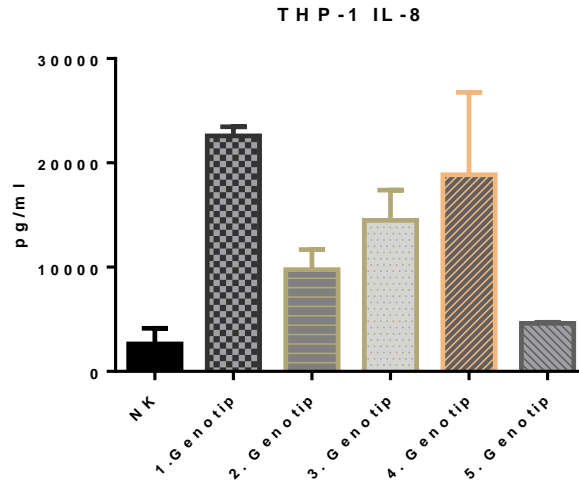
#### 4.2.3. THP-1 Hücresinde IL-8 Yanıtı

Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 22592 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 9770 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 11484 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 18872 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 4619,5 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücresinden salınan IL-8 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 2637,5 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-4. genotip için THP-1 hücresinden salınan IL-8 düzeyi incelendiğinde; IL-8 düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek saptanırken ( $p < 0,001$ ), 5. genotip için IL-8 düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,05$ ). *H. pylori*

genotipleri IL-8 salınımı yönünden irdelediğinde; en fazla salınımın 1. genotipte olduğu belirlendi. (Şekil 4-10) *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeyleri Tablo 4-14’de verilmiştir.

**Tablo 4-14: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeyleri**

THP-1 IL-8	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	4131	1144	2637,5	-	-
1. Genotip	23454	21730	22592	21,34	< 0,001
2. Genotip	11693	7848	9770	7,62	< 0,001
3. Genotip	17397	13571	14484	12,67	< 0,001
4. Genotip	26760	10984	18872	17,36	< 0,001
5. Genotip	4531	4708	4619,5	2,11	< 0,05



**Şekil 4-10: *H. pylori* genotiplerine göre THP-1 hücresinden salınan IL-8 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

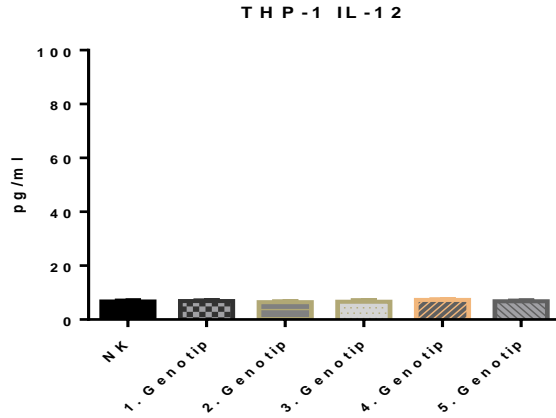
#### 4.2.4. THP-1 Hücresinde IL-12 Yanıtı

*H. pylori* farklı genotipleri ile ko-kültürü yapılan THP-1 hücresinden salınan IL-12 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 6,85 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 6,45 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 6,65 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 7,25 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 6,75 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücresinden salınan IL-12 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 6,7 pg/ml olarak tesbit

edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için THP-1 hücresinden salınan IL-12 düzeyi incelendiğinde; IL-12 düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ). *H. pylori* genotipleri IL-12 salınımı yönünden irdelediğinde; IL-12 salınımının aynı düzeylerde olduğu belirlendi. (Şekil 4-11) *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-12 düzeyleri Tablo 4-15’de verilmiştir.

**Tablo 4-15: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-12 düzeyleri**

THP-1 IL-12	1. Deneysel Sonucu (pg/ml)	2. Deneysel Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	7	6,4	6,7	-	-
1. Genotip	7,1	6,6	6,85	0,06	$> 0,05$
2. Genotip	6,8	6,1	6,45	-0,1	$> 0,05$
3. Genotip	7,2	6,1	6,65	-0,02	$> 0,05$
4. Genotip	7	7,5	7,25	0,23	$> 0,05$
5. Genotip	6,5	7	6,75	0,02	$> 0,05$



**Şekil 4-11: *H. pylori* genotiplerine göre THP-1 hücresinden salınan IL-12 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

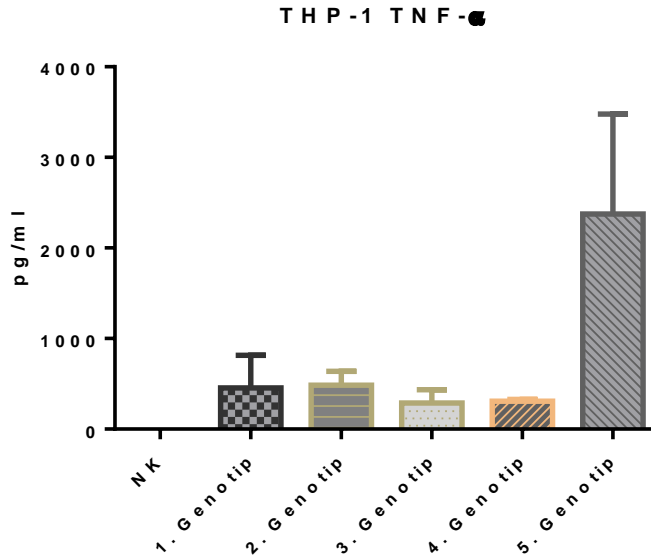
#### 4.2.5. THP-1 Hücresinde TNF- $\alpha$ Yanıtı

Beş farklı genotipteki *H. pylori* kökenleri ile ko-kültürü yapılan THP-1 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 456 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 484,5 pg/ml, *H. pylori* 3.

genotip için 288 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 307,5 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 2374,5 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 1,65 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için THP-1 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyi incelendiğinde; TNF- $\alpha$  düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,001$ ). *H. pylori* genotipleri TNF- $\alpha$  salınımı yönünden irdelediğinde; en fazla salınımın 5. genotipte olduğu belirlendi. (Şekil 4-12) *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan TNF- $\alpha$  düzeyleri Tablo 4-16'da verilmiştir.

**Tablo 4-16: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan TNF- $\alpha$  düzeyleri**

THP-1 TNF- $\alpha$	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	0	3,3	1,65	-	-
1. Genotip	97	815	456	783,3	< 0,001
2. Genotip	332	637	484,5	832,5	< 0,001
3. Genotip	142	434	288	493,7	< 0,001
4. Genotip	288	327	307,5	527,3	< 0,001
5. Genotip	3478	1271	2374,5	4091,1	< 0,001



**Şekil 4-12: *H. pylori* genotiplerine göre THP-1 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyleri**

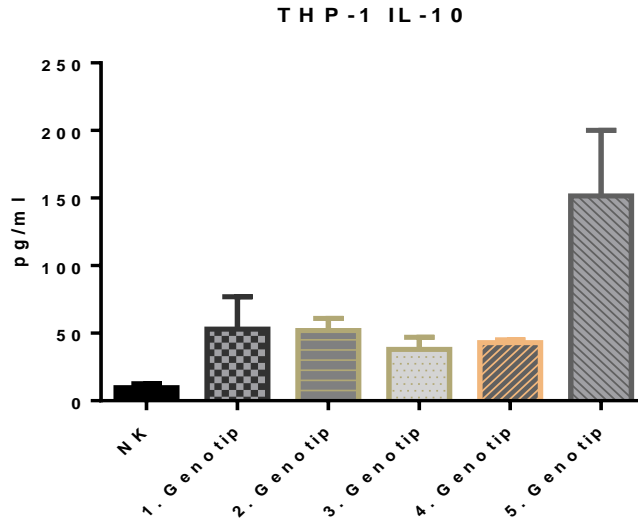
\*NK: Negatif Kontrol

#### 4.2.6. THP-1 Hücresinde IL-10 Yanıtı

Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 53 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 52 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 38 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 43 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 151 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücresinden salınan IL-10 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 9,75 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için THP-1 hücresinden salınan IL-10 düzeyi incelendiğinde; IL-10 düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,001$ ). *H. pylori* genotipleri IL-10 salınımı yönünden irdelendiğinde; en fazla salınımın 5. genotipte olduğu belirlendi. (Şekil 4-13) *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeyleri Tablo 4-17’de verilmiştir.

**Tablo 4-17: *H. pylori* genotiplerinin THP-1 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeyleri**

THP-1 IL-10	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	12,5	7	9,75	-	-
1. Genotip	29	77	53	12,5	< 0,001
2. Genotip	43	61	52	12,24	< 0,001
3. Genotip	29	47	38	8,18	< 0,001
4. Genotip	45	41	43	9,63	< 0,001
5. Genotip	200	103	151	40,94	< 0,001



**Şekil 4-13: *H. pylori* genotiplerine göre THP-1 hücresinden salınan IL-10 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

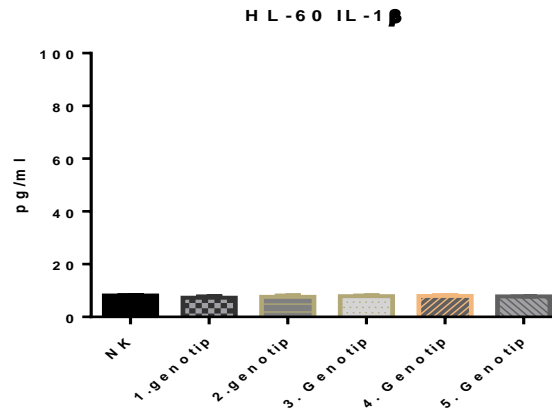
#### 4.2.7. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-1 $\beta$ Yanıtı

*H. pylori* farklı genotipleri ile ko-kültürü yapılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 7,25 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 7,65 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 7,85 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 7,95 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 7,75 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 8,1 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  düzeyi incelendiğinde; IL-1 $\beta$  düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). *H. pylori* genotipleri IL-1 $\beta$  salınımı yönünden irdelendiğinde; IL-1 $\beta$  salınımının aynı düzeylerde olduğu belirlendi. (Şekil 4-14) *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-1 $\beta$  düzeyleri Tablo 4-18'de verilmiştir.



**Tablo 4-18: *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-1 $\beta$  düzeyleri**

Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 IL-1 $\beta$	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	8,3	7,9	8,1	-	-
1. Genotip	7,8	6,7	7,25	-0,29	> 0,05
2. Genotip	8,1	7,2	7,65	-0,15	> 0,05
3. Genotip	8,1	7,6	7,85	-0,08	> 0,05
4. Genotip	8,3	7,6	7,95	-0,05	> 0,05
5. Genotip	7,7	8,7	7,75	-0,12	> 0,05



**Şekil 4-14: *H. pylori* genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL- $\beta$  düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

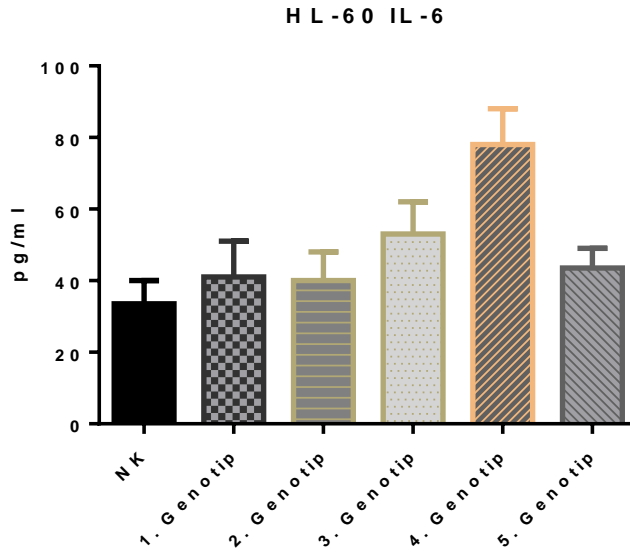
#### 4.2.8. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-6 Yanıtı

Beş farklı genotipteki *H. pylori* kökenleri ile ko-kültürü yapılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-6 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 41 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 40 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 53 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 78 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 43,5 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-6 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 33,5 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 4. genotip için nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-6 düzeyi incelendiğinde; IL-6 düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek ( $p < 0,001$ ) saptanırken, 1. genotip, 2. genotip, 3. genotip ve 5. genotip için IL-6 düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ).

*H. pylori* genotipleri IL-6 salınımı yönünden irdelediğinde; en fazla IL-6 salınımının 4. genotipte olduğu belirlendi. (Şekil 4-15) *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-6 düzeyleri Tablo 4-19'da verilmiştir.

**Tablo 4-19: *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-6 düzeyleri**

Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 IL-6	1. Deneysel Sonucu (pg/ml)	2. Deneysel Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	27	40	33,5	-	-
1. Genotip	31	51	41	0,63	> 0,05
2. Genotip	32	48	40	0,55	> 0,05
3. Genotip	44	62	53	1,65	> 0,05
4. Genotip	68	88	78	3,77	< 0,001
5. Genotip	38	49	43,5	0,84	> 0,05



**Şekil 4-15: *H. pylori* genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-6 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

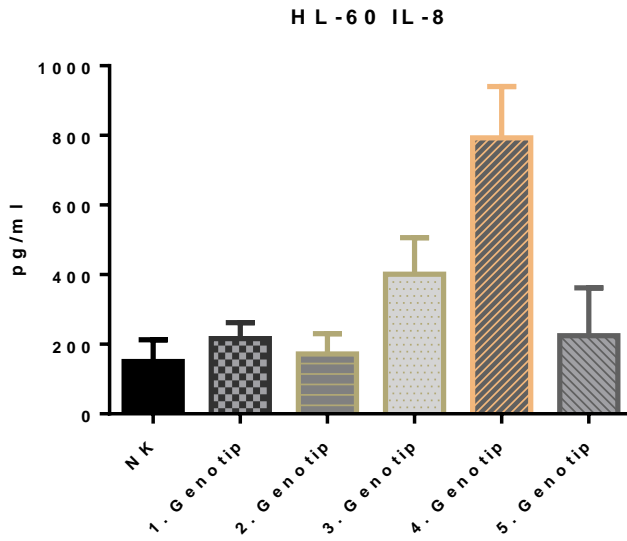
#### 4.2.9. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-8 Yanıtı

Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney

sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 216 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 172 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 401 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 792,5 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 224,5 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-8 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 150 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 3. genotip ve 4. genotip için nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-8 düzeyi incelendiğinde; IL-8 düzeyi negatif kontrole göre istatistiksel yönden çok ileri düzeyde anlamlı olarak yüksek ( $p < 0,001$ ) saptanırken, 1. genotip, 2. genotip ve 5. genotip için IL-8 düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ). *H. pylori* genotipleri IL-8 salınımı yönünden irdelediğinde; en fazla IL-8 salınımının 4. genotipte olduğu belirlendi (Şekil 4-16). *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeyleri Tablo 4-20’de verilmiştir.

**Tablo 4-20: *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-8 düzeyleri**

Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 IL-8	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	213	87	150	-	-
1. Genotip	262	170	216	1,24	> 0,05
2. Genotip	230	114	172	0,41	> 0,05
3. Genotip	506	296	401	4,73	< 0,001
4. Genotip	940	645	792,5	12,12	< 0,001
5. Genotip	362	87	224,5	1,4	> 0,05



**Şekil 4-16: *H. pylori* genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-8 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

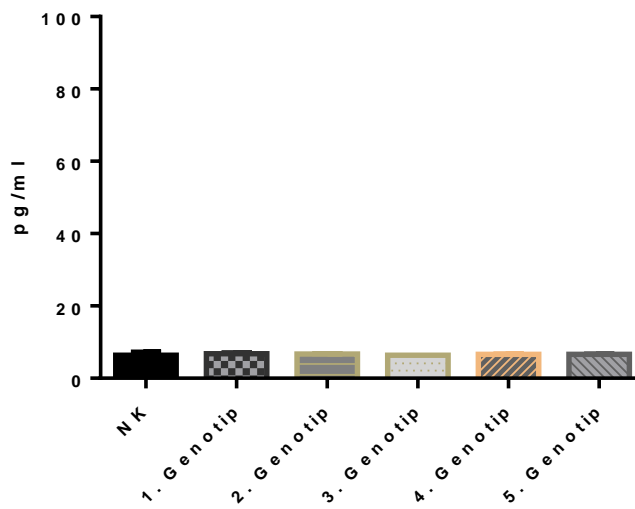
#### 4.2.10. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-12 Yanıtı

*H. pylori* farklı genotipleri ile ko-kültürü yapılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-12 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 6,8 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 6,7 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 6,4 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 6,6 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 6,65 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-12 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 6,4 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-12 düzeyi incelendiğinde; IL-12 düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). *H. pylori* genotipleri IL-12 salınımı yönünden irdelendiğinde; IL-12 salınımının aynı düzeylerde olduğu belirlendi (Şekil 4-17). *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-12 düzeyleri Tablo 4-21’de verilmiştir.

**Tablo 4-21: *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-12 düzeyleri**

Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 IL-12	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	7,2	5,6	6,4	-	-
1. Genotip	7	6,6	6,8	0,17	> 0,05
2. Genotip	6,6	6,8	6,7	0,13	> 0,05
3. Genotip	6,4	6,4	6,4	0	> 0,05
4. Genotip	6,5	6,7	6,6	0,08	> 0,05
5. Genotip	6,7	6,6	6,65	0,001	> 0,05

**HL - 6 0 IL - 1 2**



**Şekil 4-17: *H. pylori* genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan IL-12 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

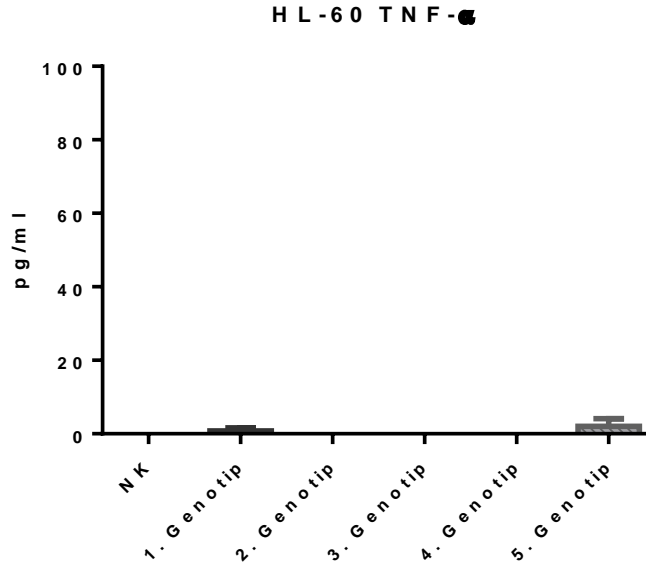
#### 4.2.11. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde TNF- $\alpha$ Yanıtı

Beş farklı genotipteki *H. pylori* kökenleri ile ko-kültürü yapılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 0,8 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için 0 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 0 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 0 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 2,05 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 0 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyi incelendiğinde; TNF- $\alpha$  düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark

saptanmadı( $p>0,05$ ). *H. pylori* genotipleri TNF- $\alpha$  salınımı yönünden irdelediğinde; TNF- $\alpha$  salınımının aynı düzeylerde olduğu belirlendi(Şekil 4-18). *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan TNF- $\alpha$  düzeyleri Tablo 4-22’de verilmiştir.

**Tablo 4-22: *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan TNF- $\alpha$  düzeyleri**

Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 TNF- $\alpha$	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	Z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	0	0	0	-	-
1. Genotip	0	1,6	0,8	0	> 0,05
2. Genotip	0	0	0	0	> 0,05
3. Genotip	0	0	0	0	> 0,05
4. Genotip	0	0	0	0	> 0,05
5. Genotip	0	4,1	2,05	0	> 0,05



**Şekil 4-18: *H. pylori* genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

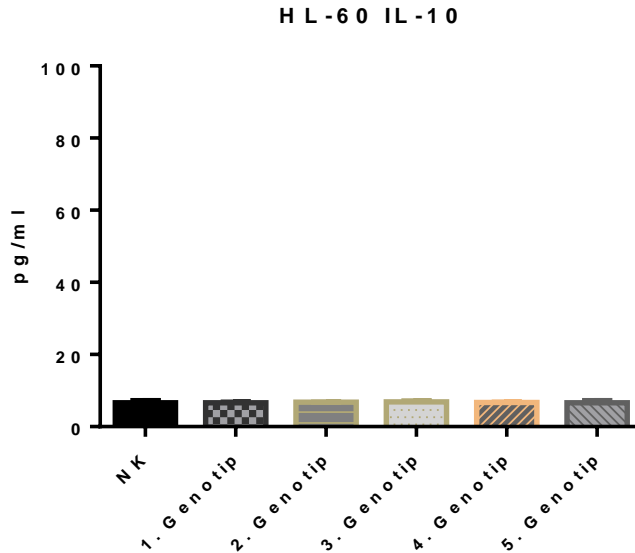
#### 4.2.12. Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 Hücresinde IL-10 Yanıtı

Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeylerinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması; *H. pylori* 1. genotip için 6,6 pg/ml, *H. pylori* 2. genotip için

6,75 pg/ml, *H. pylori* 3. genotip için 6,85 pg/ml, *H. pylori* 4. genotip için 6,7 pg/ml ve *H. pylori* 5. genotip için 6,6 pg/ml saptanırken, negatif kontrol olarak kullanılan nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-10 düzeyinin 1. deney ve 2. deney sonuçlarının ortalaması ise 6,6 pg/ml olarak tesbit edildi. *H. pylori* 1-5. genotip için nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-10 düzeyi incelendiğinde; IL-10 düzeyinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ). *H. pylori* genotipleri IL-10 salınımı yönünden incelendiğinde; IL-10 salınımının aynı düzeylerde olduğu belirlendi (Şekil 4-19). *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeyleri Tablo 4-23'de verilmiştir.

**Tablo 4-23: *H. pylori* genotiplerinin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücresi ile ko-kültürü sonucunda salınan IL-10 düzeyleri**

Nötrofile Farklılaştırılmış HL-60 IL-10	1. Deney Sonucu (pg/ml)	2. Deney Sonucu (pg/ml)	Ortalama Sonuç (pg/ml)	z değeri	p değeri
Negatif Kontrol	7,2	6	6,6	-	-
1. Genotip	6,4	6,8	6,6	0	$> 0,05$
2. Genotip	6,8	6,7	6,75	0,06	$> 0,05$
3. Genotip	6,6	6,8	6,85	0,1	$> 0,05$
4. Genotip	6,8	6,6	6,7	0,04	$> 0,05$
5. Genotip	7,1	6,6	6,6	0	$> 0,05$



**Şekil 4-19: *H. pylori* genotiplerine göre nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan IL-10 düzeyleri**

\*NK: Negatif Kontrol

#### 4.2.13. Genotiplere Göre Salınan Sitokin Düzeyleri ve Histopatolojik Veriler

Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenleri ile THP-1 hücresinden salınan sitokinler açısından genotipleri değerlendirdiğimizde; 1-5. genotiplerdeki *H. pylori* kökenlerinin IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve IL-10 salınımını indüklediği saptanırken, IL-12 salınımını saptanmadı. Farklı genotipler temelinde, salınan sitokin düzeylerine bağlı olarak histopatolojik verilerin ilişkisi irdelendiğinde;

Çalışmamıza aldığımız farklı genotipler içerisinde genel olarak en yüksek düzeylerde sitokin salınımına neden olan *H. pylori* *cagA*, *vacAs2/m2* gen bölgelerini taşıyan 5. genotipteki *H. pylori* kökeninin, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 salınımını en yüksek (1. sırada) düzeyde indüklediği belirlenirken, IL-8 salınımını en az (5. sırada) düzeyde indüklediği tesbit edildi ve üretildiği hastaya ait histopatolojik verileri ile hastanın; oksintik mide mukozasında hafif derecede aktif, hafif derecede kronik gastrit, antrum mukozasında şiddetli aktif, orta derecede kronik gastrit tanısı aldığı saptandı.

*H. pylori* *cagA*, *vacAs1/m2* gen bölgelerini taşıyan 1. genotipteki *H. pylori* kökeninin, IL-8 salınımını en yüksek (1. sırada) düzeyde indüklediği belirlenirken, salınan IL-10 düzeyini 2. sırada yükselttiği ve IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  salınımını ise 3. sırada yükselttiği tesbit edildi ve üretildiği hastaya ait histopatolojik verileri ile hastanın; korpus mukozasında inaktif hafif derecede kronik gastrit, antrum mukozasında hafif derecede aktif, hafif derecede kronik gastrit ve lenfoid agregat varlığı tanısı aldığı saptandı.

*H. pylori* *cagA*, *vacAs1/m1* gen bölgelerini taşıyan 2. genotipteki *H. pylori* kökeninin, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  sitokinlerinin düzeyini 2. sırada yükselttiği belirlenirken, salınan IL-10 düzeyini 3. sırada yükselttiği ve IL-8 salınımını ise 4. sırada yükselttiği tesbit edildi ve üretildiği hastaya ait histopatolojik verileri ile hastanın; korpus mukozasında hafif-orta derecede aktif orta derecede kronik gastrit, lamina propriada orta derecede eozinofil artışı, foveolar mukozada fokal komplet tip intestinal metaplazi tanısı aldığı saptandı.

*H. pylori* *vacAs2/m2* gen bölgesini taşıyan 4. genotipteki *H. pylori* kökeninin, IL-8 sitokininin düzeyini 2. sırada yükselttiği belirlenirken, salınan IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 düzeyini 4. sırada yükselttiği ve IL-1 $\beta$  salınımını ise 5. sırada yükselttiği tesbit edildi ve üretildiği hastaya ait histopatolojik verileri ile hastanın; antrum mukozasında şiddetli aktif, orta derecede kronik gastrit, lenfoid folikül varlığı tanısı aldığı saptandı.



*H. pylori* cagA, vacAs1/m2 ve babA2 gen bölgelerini taşıyan 3. genotipteki *H. pylori* kökeninin, IL-8 sitokininin düzeyini 3. sırada yükselttiği belirlenirken, salınan IL-1 $\beta$  düzeyini 4. sırada yükselttiği ve IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 salınımını ise 5. sırada yükselttiği tesbit edildi ve üretildiği hastaya ait histopatolojik verileri ile hastanın; korpus mukozasında inaktif hafif derecede kronik gastrit, antrum mukozasında şiddetli derecede aktif orta derecede kronik gastrit, komplet tip intestinal metaplazi ve lenfoid agregat varlığı tanısı aldığı saptandı.

Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenleri ile nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden salınan sitokinler açısından genotipleri değerlendirdiğimizde; tüm genotipler içerisinde yalnızca 4. genotipteki *H. pylori* kökeninin IL-6 salınımını indüklediği saptanırken(p<0,001), diğer genotiplerde IL-6 salınımı saptanmadı. Ayrıca 4. genotipteki *H. pylori* kökeninin 1. sırada(p<0,001) 3. genotipteki *H. pylori* kökeninin ise 2. sırada(p<0,001) IL-8 salınımını indüklediği saptanırken, diğer genotiplerde IL-8 salınımı saptanmadı. Farklı genotiplerdeki *H. pylori* kökenleri ile nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinden IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  ve IL-10 salınımı ise saptanmadı.

## 5. TARTIŞMA

*Helicobacter pylori* dünya nüfusunun yarısından fazlasında persistan kolonizasyonla gastrik mukozayı enfekte ettiği bilen Gram negatif bir bakteridir ve kronik aktif gastrit, peptik ülser, gastrik kanser ve MALT lenfoma gelişmesinde primer risk faktörüdür(20,176). Fakat *H. pylori* ile enfekte pek çok kişide asemptomatik enfeksiyon görülebilmekteyken bu kişilerde gastrik kanser gelişmesi için sadece enfeksiyonun virulansı yeterli olmamakta ve bu bağlamda *H. pylori* kolonizasyonuna bağlı olarak gastrik mukozal enflamasyonun şiddetinde, dolayısıyla enfeksiyonun klinik sonuçlanmasında konağın genetik yatkınlığı, immün yanıt, enfeksiyonun edinilme yaşı, beslenme, çevresel faktörler ve bakteriyel faktörler oldukça önemli rol almaktadır(177,178). Bakteriyel determinantların konak epitel hücresi ile yakın etkileşimin başlamasında ve mukozal enflamasyonun oluşmasında kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir(179).

*H. pylori*'nin persistan kolonizasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan klinik tabloların gelişmesinde bakterinin gastrik mukozaya kolonizasyonu en önemli faktörlerden biriyken, yapılan ultrastrüktürel çalışmalarda bakterilerin büyük çoğunluğunun gastrik epitel örtün mucus tabakasının içine doğru hareket ettiği görülmüştür(180). Kronik kolonizasyonun oluşmasında oldukça önemli rolü olan *H. pylori*'nin gastrik mukozaya adezyonunun, bakteriyel virulans faktörleri arasındaki babA2 geni tarafından kodlanan BabA proteini ile gastrik mukozada eksprese edilen kan grubu antijeni Lewis b'ye bağlanarak gerçekleştiği bilinmektedir(181). Bu bağlanma ile *H. pylori*'nin kolonizasyonu sonucunda CagA ve VacA gibi etkin virulans faktörlerinin üretilmesinin etkisiyle gelişen şiddetli gastrik enflamasyondaki mekanizma; *H. pylori* ve gastrik epitel arasındaki temas sonrası CagA ve VacA proteinleri aracılığıyla konak hücrenin sinyal transdüksiyon yollarını manüple edebilmesi ve bunun sonucunda IL-8 gibi proenflamatuar sitokinlerin indüksiyonu ile gerçekleşmektedir(53). Üçlü-pozitif kökenler olarak adlandırılan cagA-vacAs1-babA2 genlerini taşıyan *H. pylori* kökenlerinin babA2 taşımayan kökenlere göre duodenal ülser ve adenokarsinoma ve ayrıca şiddetli histolojik değişiklikler ile daha sıklıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir(182).

Gastrik mukozaya kolonizasyonun ardından gastrik patolojilerin ortaya çıkması ile ilişkili olarak, *H. pylori*'nin virulans faktörleri arasında cagPAI ve vacA genleri önemli rol almaktadır(183). *H. pylori*'nin en önemli virulans faktörü olan cagPAI'yi taşıyan kökenlerin cagPAI negatif kökenlere göre gastrik enflamasyonu indükleyerek peptik ülser ve gastrik karsinogenezde güçlü bir risk faktörü olduğu bilinmektedir(55). *H. pylori*'nin gastrik mukozaya kolonizasyonunun ardından cagPAI'de kodlanan T4SS ile konak epitel hücrelerine transfer edilen CagA proteini sitoskeletal yeniden yapılanmaları başlatarak NF- $\kappa$ B aktivasyonunu ve epitel hücrelerinden IL-8 salınımını indüklemektedir(184). Nitekim cagPAI içeren *H. pylori* kökenlerinin daha şiddetli antral enflamasyon ve yüksek düzeylerde mukozal IL-1 $\beta$  ve IL-8 salınımı, peptik ülser ve artmış asit sekresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(69,185,186).

CagA proteinini üreten cagPAI gen bölgesini içeren *H. pylori* kökenleri Tip 1 kökenler olarak adlandırılırken, gastrik mukozada enflamasyon artması ile birlikte hücre iskeletinde değişiklikler ve gastrik mukozada metaplazi ile ilişkili olduğu bilinmesine karşılık, Tip II kökenler olarak adlandırılan ve cagPAI taşımayan kökenlerin ise, non-ülser dispepsi gibi hafif seyirli gastrointestinal rahatsızlıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir(69,187,188,189,190). Bu bağlamda Tip 1 kökenler Tip 2 kökenlere göre şiddetli gastrik mukozal enflamasyon artışına bağlı olarak, peptik ülser gelişimi ve mide kanseri gelişmesi açısından önemli risk faktörü olarak değerlendirilmektedir(55). Doğu Asya ülkelerindeki CagA+ kökenler ile atrofik gastrit, gastrik kanser gibi gastroduodenal patolojiler daha yüksek oranda ilişkili olmakla birlikte, Batı toplumlarında da *H. pylori* cagA+ kökenler, şiddetli enflamatuvar yanıt gelişmesine bağlı olarak peptik ülser ve gastrik kanser gibi gastroduodenal patolojilerle ilişkilendirilmektedir(143,191,192). Bu iki coğrafi bölge arasındaki mide kanseri sıklığındaki farkın Batı ve Doğu Asya tip CagA proteinlerinin biyolojik aktiviteleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir(88,75).

CagA proteinin aktivitesi için gerekli olan tirozin fosforilasyon bölgesi olan ve cagA geninin değişken 3' ucunda yer alan EPIYA motifinin bulunduğu bölgedeki farklı amino asit dizilerine göre EPIYA A, B, C veya D olarak tanımlanan 4 tip EPIYA segmenti vardır(81,83,91,193). Coğrafi konuma göre Batı tip CagA; ülkemiz de dahil Avrupa, Amerika, Avustralya ve Afrika'da yaygın olan EPIYA-A, EPIYA-B ve Batı tip CagA'ya özgü EPIYA-C segmentlerini içerirken, Doğu tip CagA ise; Japonya, Kore ve Çin gibi Doğu Asya ülkelerinde yaygın olan EPIYA-A, EPIYA-B, ve Doğu Asya

kökenleri için spesifik olan EPIYA-D segmentlerini içermektedir(63,64,84,85,86,94). EPIYA segmentlerindeki farklılıklarla ilişkili olarak Doğu Asya tip CagA taşıyan *H. pylori* kökenleri Batı tip CagA taşıyan *H. pylori* kökenlerine göre gastrik epitel hücrelerinden daha yüksek miktarda IL-8 salgılanmasına neden olmaktadır, Batı tip CagA EPIYA-C segment sayısındaki varyasyonlar da gastrik kanser riski açısından önemli bir faktör olarak rol almaktadır(71,87,92).

*H. pylori*'nin ikinci en önemli virulans faktörü olan ve gastrik epitel hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyonu indükleyen vacA gen bölgesi tarafından kodlanan VacA proteini *H. pylori* ile enfekte hastalarda gastrit şiddetinin artması ve immün sistem hücrelerinde proenflamatuar yanıtın indüklenmesi ile ilişkilendirilirken, aynı zamanda bu proteinin gastrik mukozada lokal immünsupresif aktivitesinin olduğu ileri sürülmektedir(75,83,194,195). *H. pylori*'nin genotipine bağlı olarak özellikle cagA, vacAs1m1 taşıyan Tip 1 kökenlerin patogeneğinde, CagA ile birlikte aktif olarak üretilen VacA proteininin etkisiyle daha kuvvetli enflamasyona ve gastrik mukozada daha kuvvetli epitel hasarına neden olduğu bilinmektedir(101,196). Bu noktada *H. pylori* vacA geni tüm kökenlerde bulunmasına karşın vakuolizasyon aktivitesindeki farklılıklarda vacAs1 alleli, özellikle de vacAs1m1 kombinasyonu s2 allele göre daha fazla toksin üreterek rol almaktadır. *H. pylori*'nin patogeneğinde Batı toplumlarındaki *H. pylori*'nin toksin aktivitesi ile vacAs1m1 gen bölgesi arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmekteyken, aktif toksin üreten *H. pylori* vacAs1 gen bölgesini taşıyan kökenler ile peptik ülser ilişkisinin daha yüksek oranda olduğu, daha az toksijenik olan vacAs2 alleli ise zayıf enflamasyonla birlikte nadiren peptik ülser neden olabileceği bildirilmiştir(1,6,101).

*H. pylori* enfeksiyonunun erken döneminde gastrik lamina proprianın istilası olmazken histolojik olarak T lenfositlerin, plazma hücrelerinin, makrofajların, mononükleer fagositlerin ve nötrofillerin gastrik mukozaya infiltrasyonu ile birlikte, konak immün yanıtında kilit nokta olan gastrik mukozada IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- $\alpha$  gibi çeşitli proenflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretilmesi gerçekleşmektedir(176,197,198). Proenflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin indüklenmesi; nötrofillerin, monositlerin, makrofajların veya dendritik hücrelerin enfeksiyon bölgesine çekilmesini ve sonra enflame bölgeye migrasyonunu ve doğal enflamatuar yanıtın aktive olmasına olanak sağlamaktadır. Nötrofillerin gastrik enflamasyona katılımı *H. pylori*'nin ortadan kaldırılması ile ilişkiliyken, monosit türevi

olan mukozal makrofajlar ve dendritik hücreler patojen antijenlerini yakalayıp sindirmektir. Bu enflamatuvar hücrelerden, *H. pylori* enfeksiyonu sonucunda meydana gelen patolojik değişikliklere neden olan gastrik epitel hasarına yol açan büyük miktarlarda reaktif oksijen radikallerinin salınımı olmakta, ayrıca gelişen spesifik antikor yanıtı gastrik mukusta bakteriyel enfeksiyonun eradikasyonuna yardımcı olmaktadır(199,200). *H. pylori*'ye karşı koruyucu immünitede CD4<sup>+</sup> T hücreleri önemli rol alırken, oluşan Th1 ve antikor yanıtına karşın hastalarda enfeksiyon tam olarak ortadan kaldırılamamaktadır(200,201,202). Bu noktada *H. pylori*'nin koruyucu immüniteden kaçabilmek için geliştirdiği çeşitli stratejiler rol almaktadır. Örneğin *H. pylori* gastrik epitel hücrelerinde, makrofajlarda ve T hücrelerinde apoptozisi indüklemektedirken, ayrıca lokal olarak üretilen proenflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinler arasındaki denge T hücre gelişimini, immün yanıtın etkisini ve dolayısıyla gastrik patolojiyi etkileyebilmektedir(16,61,203,204). Erken ve persistan Th1 dominant CD4 yanıtı kronik enfeksiyonun önlenmesinde önemliyken, aynı zamanda gastrik enflamasyonun daha da şiddetlenmesine neden olmaktadır. Bunun aksine, kronik enfeksiyon gelişmesi Th1 yanıtının zayıf olması ya da yokluğu ve Th2 tip sitokinlerin üretilmesi ile ilişkili olarak sadece minimal gastrit gelişmektedir(118,205).

Th1 yanıtında rol alan proenflamatuvar sitokinlerden nötrofiller için kemotaktik ve aktivatör etkisiyle özellikle IL-8 *H. pylori* ile ilişkili hastalıklarda oldukça önemli bir faktör olarak, *H. pylori* reseptörlerini içeren konak genetik faktörleri ile birlikte *H. pylori*'nin indüklediği gastrik mukozal hasarda primer rol almaktadır(206,207). Özellikle cagPAI içeren *H. pylori* kökenleriyle ilişkili olmakla birlikte, *H. pylori* epitel hücreleri ile temas ettiğinde bu hücrelerden IL-8 gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretimi başlamaktadır(13,53,127). *H. pylori* enfeksiyonu ile stimüle olan IL-8, gastrik mukozada nötrofillerin toplanmasına ve IL-1 $\beta$  gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olmaktadır. IL-1 $\beta$  da güçlü bir proenflamatuvar sitokin olarak *H. pylori* enfeksiyonuna karşı gelişen immün yanıtın başlamasında ve artarak devam etmesinde major rol oynayan bir diğer sitokindir ve gastrik asit sekresyonu üzerine inhibitör olarak etki göstermektedirken, cagA gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile enfekte ülserli hastaların biyopsi örneklerinde IL-1 $\beta$  mRNA ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir(208,209,210). *H. pylori* enfeksiyonlarına bağlı gelişen gastrik enflamasyonda esas süreçlerden biri olarak enflamatuvar hücrelerden IL-1 $\beta$  gibi TNF- $\alpha$  da üretilmektedir(10) ve *H. pylori* pozitif hastalarda *H. pylori* negatif hastalara oranla

TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir(211,212). *H. pylori* enfeksiyonlarında artmış mukozal IL-1 $\beta$  ve/veya TNF- $\alpha$  üretimi; gastrik asit sekresyonunun güçlü bir şekilde baskılanmasıyla birlikte gastrik mukozal enflamasyonun ilerlemesi ile sonuçlanabilmektedir(213). Ayrıca *H. pylori* enfeksiyonlarında artan IL-6 düzeyi özellikle *H. pylori*'ye bağlı atrofik gastrit şiddeti ile ilişkilendirilmektedir(214). Hayvan modeli bir çalışmada *H. pylori* enfeksiyonunu takiben 8. haftada IL-6 düzeyinin pik yaptığı bildirilmişken, diğer bir çalışmada ise *H. pylori* ile enfekte gastrik mukozada makrofajların IL-6 için major kaynak olduğu bildirilmiştir(215,216). Ayrıca IFN- $\gamma$  ile birlikte IL-12 yanıtının *H. pylori* enfeksiyonlarının patogeneğinde ve ülser gelişmesinde önemli rolünün olduğu bilinmekte ve çeşitli çalışmalarda *H. pylori* ile enfekte kişilerin gastrik mukozasında yüksek düzeylerde IL-12 salınımı, artmış IL-12 mRNA ekspresyonu ve *H. pylori*-pozitif hastalar ile *H. pylori*-negatif gastritli hastalar karşılaştırıldığında IL-12 düzeyinin hasta grubunda arttığı bildirilirken, buna karşılık *H. pylori* ile enfekte hastaların gastrik mukozasında IL-12 düzeyinin yükselmediğini bildiren literatür bilgisi de mevcuttur(217,218,219,220). Aynı zamanda *H. pylori* enfeksiyonunda IL-10, Th1 yanıtının süpresyonuyla birlikte persistan enfeksiyonda ve enfeksiyona bağlı olarak gelişen immünopatolojilerin önlenmesinde esas rol alarak proenflamatuar sitokinlerin etkilerini dengelemektedir, bunu özellikle IL-12 gibi çeşitli proenflamatuar sitokinlerin inhibisyonuyla Th1 yanıtını azaltarak gerçekleştirmektedir(200,207,221).

*H. pylori*'nin gastrik mukozaya kolonize olabilmesi için konağın multipl doğal savunma mekanizmalarını geçebilmesi gerekmektedir ve enfeksiyon bakteriyel adezyon molekülleri ve konak reseptörleri arasındaki etkileşim ile başlayarak sonrasında immün yanıtı kaçabilme yeteneği ile persistan hale gelmektedir. Konak immün sistemi tarafından tanınmaması, spesifik bakteriyel faktörler ile selektif konak genlerinin ekspresyonunun stimülasyonu ve etkisiz T hücre yanıtının oluşması sonucunda gelişen persistan enfeksiyon ile *H. pylori*'ye bağlı gastroduodenal hastalıklar meydana geldiği bilinmektedir(205). *H. pylori*'ye bağlı ciddi gastroduodenal hastalıkların gelişmesindeki mekanizma tam olarak anlaşılammış olsa da; kemoatraktan ve proenflamatuar sitokinlerin indüksiyonu sonucunda gelişen enflamasyon ve gastrik hasar majör faktör olarak rol almaktadır(20). Özellikle son yıllarda gastrik hasar ve enflamasyonun oluşumunda ya da şiddetindeki farklılıkların gelişiminde rolü olduğu ileri sürülen multifaktörler ve bununla ilişkili mekanizmalardaki en dikkat çekenin ve üzerinde

durularının farklı coğrafik bölgelerde genotipe spesifik *H. pylori* enfeksiyonlarının modülasyonunda konağın immün sistem hücrelerinin yanıtlarının farklılığı olup bunun da konağın bireysel klinik patolojisini etkilemesidir.

Bu bağlamda çalışmamızda Avrupa ve Asya (Avrasya) coğrafik özellikleri olan Türkiye'nin bu coğrafik özelliği bakımından bir prototipi olan İstanbul ve çevre popülasyonundan izole edilen genotipleri farklı *H. pylori* kökenlerinin in-vitro ortamda nötrofil ve makrofaq öncül hücreleri olan monosit hücre hattında oluşturdukları proenflamatuar ve anti-enflamatuar sitokin yanıtları saptanarak, *H. pylori*'nin patogenezinde farklı genotipler ve bu sitokinler arasındaki ilişkinin belirlenmesi ile birlikte bunun konağın gastroduodenal patolojilerine etkilerinin irdelenmesi amaçlandı. Bu amaçla farklı genotipleri belirleyebilmek için *H. pylori*'nin patogenezinde ve klinik tabloların ortaya çıkışında oldukça önemli rolü olan birçok faktörle birlikte bakteriye ait gen bölgeleri arasından özellikle *H. pylori* *cagA* gen bölgesi başta olmak üzere *vacAs1/s2*, *vacAm1/m2* ve *babA2* gen bölgelerinin varlığı araştırıldı. Bu gen bölgelerini farklı şekillerde içeren kökenlerin farklı paterndeki genotiplerinin in-vitro ortamda nötrofil ve monosit hücre hattında, *H. pylori*'nin patogenezinde katkıda bulunan proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin olan IL-10 düzeyleri saptanarak değerlendirildi ve bunun konağın gastroduodenal patolojileriyle ilişkisi irdelendi.

Çalışmamıza aldığımız farklı genotiplerden *cagA*, *vacAs2m2* gen bölgelerini taşıyan 5. genotip *H. pylori* kökeninin ko-kültürü sonucunda THP-1 hücresinden IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 salınımı negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek saptanmış ( $p<0,001$ ) ve aynı zamanda Genotip 5 diğer genotiplere göre IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 salınımının en yüksek saptandığı genotip olmuştur. Genotip 5'in diğer genotiplere göre 5. sırada salınımına neden olduğu IL-8 ise negatif kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur( $p<0,05$ ). IL-12 salınım düzeyi ise negatif kontrole göre anlamsızdı( $p>0,05$ ). Genotip 5'in nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda ise ; proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 salınım düzeyi negatif kontrole göre anlamsız düzeydeydi( $p>0,05$ ).

Yaptığımız literatür araştırması sonucunda *cagA* ve *vacAs2m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinde

oluşan sitokin yanıtları üzerine yapılan bir lüteratür bilgisine ulaşamamış olmamıza karşın aynı genotiple yapılan farklı hücre ko-kültür çalışmaları irdelendiğinde;

Kranzer ve ark.'nın(222) 2005 yılında yaptıkları çalışmada; bizim 5. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile aynı genotipteki *cagA* ve *vacAs2m2* gen bölgelerini taşıyan ve araştırmacıların HP4 olarak tanımladıkları *H. pylori* kökeninin ko-kültürü dendritik hücrelerle yapılmış ve bu hücrelerden IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-8, IL-12 ve IL-10 sitokinlerinin salınımının negatif kontrole göre oldukça yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir. Her ne kadar bizim çalışmamızda kullandığımız hücre hatları THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 bu çalışmada kullanılan hücrelerden farklı olsa da benzer genotipe bağlı sitokin salınımının sonuçlarının paralellik içinde olduğu belirlenmiştir.

Yine çalışmamızda *cagA* ve *vacAs2m2* gen bölgelerini taşıyan 5. genotipin diğer genotiplere göre daha düşük düzeydeki IL-8 salınımını indüklemesi ile ilgili bulgumuzla paralel olarak, 2010 yılında Schmidt ve ark.'nın(20) Çin, Hindistan ve Malezya'lı hastalarla yaptıkları çalışmada; *cagA* ve *vacAs2m2i2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninin AGS hücrelerinde düşük düzeyde IL-8 salınımını indüklediği saptanmıştır.

Farklı temeller üzerinde yapılan çalışmaları incelediğimizde; Salgado ve ark.'nın(223) 2002 yılında üst gastro-intestinal sistem semptomları olan hastalardan elde ettikleri klinik *H. pylori* izolatlarının lipopolisakkaritleri ve farelerle yaptıkları çalışmada; *cagA* ve *vacAs2m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninin negatif kontrole göre fare dalak hücrelerinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyini yükselttiği saptanmıştır.

Çalışmamızda saptadığımız *H. pylori* *cagA* ve *vacAs2m2* gen bölgelerini taşıyan 5. genotipin içerdiği gen bölgeleri açısından sadece *cagA* ve *vacA* gen bölgelerini içermesi nedeniyle benzerlik gösteren çalışmaları incelediğimizde; Tanigawa ve ark.(224) 2009 yılında, *H. pylori* ATCC 43505 *cagA*+ *vacA*+ kökeninin suda çözünür ekstraktları ile yaptıkları çalışmada; bizim de çalışmamızda kullandığımız ve benzer yanıt saptadığımız, THP-1 hücresinden salınan IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeyini kontrole göre oldukça yüksek saptamışlardır. Benzer olarak Chang ve ark.(221) tarafından 2012 yılında, *vacA* allelleri ile ilgili herhangi bir veri belirtilmeden *cagA* ve *vacA* gen bölgelerini içeren *H. pylori* ATCC 26695 kökeninin ko-kültürü ile monosit türevi



dendritik hücrelerden salınan TNF- $\alpha$  ve IL-10'nun kontrole göre oldukça yüksek düzeylerde olduğu bildirilmiştir.

Her ne kadar biyopsi örneklerinin doku kültüründe çalışılması ve vacA tiplendirilmesi bilinmeyen kökenlerin kullanımıyla bizim çalışmamızdan farklılık gösteren ancak bizim çalışmamızda tüm genotiplerde tanımlanmış ve *H. pylori*'nin patogenezinde önemli bir role sahip cagA'nın tek gen bölgesi olarak kullanımının yapılmasıyla sadece cagA temelinde çalışmamıza kısmen benzerlik gösteren Bodger ve ark.'nın(225) 2001 yılında bildirdikleri araştırmada; *H. pylori* ile enfekte CagA seropozitif dispepsili hastalardan alınan biyopsi örneklerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Yine CagA pozitif *H. pylori* kökeni ile 2012 yılında yapılan bir diğer çalışmada; CagA pozitif *H. pylori* 95 kökeninin indüklemesiyle tam kan hücrelerinden IL-10 salınımı negatif kontrole göre istatistiksel yönden anlamlı olarak yüksek saptanmıştır(226).

Çalışmamıza aldığımız *H. pylori* 5. genotipin sadece VacA proteininin kodlandığı vacA gen bölgesi içermesi açısından benzerlik gösteren ve bizim kullandığımız hücrelerden farklı hücrelerle Bernard ve ark.'nın(227) 2005 yılında yaptıkları çalışmada; cagA ve vacA gen bölgelerine ait ayrıntılı bilgi verilmemekle birlikte *H. pylori* VacA proteinin etkisiyle, RBL-2H3 mast hücrelerinden TNF- $\alpha$  salınımının negatif kontrole göre oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir.

İncelenen literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerimizi değerlendirdiğimizde *H. pylori* cagA, vacAs2m2 gen bölgelerini taşıyan 5. genotipteki *H. pylori* kökeninin indüklediği proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtları genel olarak literatür bilgileriyle uyumluluk gösterirken IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve IL-10 yanıtındaki şiddete bağlı olarak bu kökenin üretildiği hastaya ait histopatolojik bulguları incelersek; hastamız antrum mukozasında şiddetli aktif gastrit tanısı ve orta derecede kronik gastrit tanısına sahiptir. Nitekim; diğer genotiplere göre sitokin yanıtı açısından en kuvvetli yanıtı saptadığımız 5. genotip *H. pylori* kökenimizin üretildiği hastanın antrum mukozasındaki şiddetli aktif gastrit tanısının bu kuvvetli sitokin yanıtı ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu kökenimizle ilişkili elde ettiğimiz proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ile beraber anti-enflamatuar sitokin IL-10 kuvvetli yanıtı hastamızın aynı zamanda antrum mukozasındaki orta derecedeki kronik gastrit

tanısı ile ilişkili olabilir. Ancak oluşan kuvvetli sitokin yanıtına karşın hastamızdaki *H. pylori*'ye bağlı gastrik histopatolojilerden yalnızca gastrit tanısının bulunması da; bize bu durumun acaba persistan *H. pylori* enfeksiyonunun erken döneminde olabileceğiyle ya da *H. pylori*'ye bağlı gastrik patolojilerin ortaya çıkışında rol alan bakteriyel virulans faktörlerinin dışında kökenin izole edildiği konağa spesifik faktörlerin etkisiyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim Andres ve ark.'nın(172) 2011 yılında bildirdikleri çalışmada ileri sürdükleri; farklı genotipteki kökenlerin stimüle ettikleri hücrelerde farklı potansiyele sahip oldukları, ancak ortalama aktivasyon profillerinde bir korelasyon olduğu ve bu durumun konaktaki enflamatuar patolojiyle ilişkili olamayabileceği görüşü ile bizim bu sonucumuz paralellik göstermektedir.

Çalışmamıza aldığımız bir diğer farklı genotip olan *cagA*, *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan 1. genotip *H. pylori* kökeninin THP-1 hücresinden IL-8 salınımını negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek saptanmış ( $p < 0,001$ ) ve aynı zamanda Genotip 1 diğer genotiplere göre IL-8 salınımının en yüksek saptandığı genotip olmuştur. Genotip 1'in diğer genotiplere göre 2. sırada salınımına neden olduğu IL-10, 3. sırada salınımına neden olduğu IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  ise negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). IL-12 salınım düzeyi ise negatif kontrole göre anlamsızdı ( $p > 0,05$ ). Genotip 1'in nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda ise ; proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 salınım düzeyi negatif kontrole göre anlamsız düzeydeydi ( $p > 0,05$ ).

Yaptığımız literatür araştırması sonucunda *cagA* ve *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinde oluşan sitokin yanıtları üzerine yapılan bir literatür bilgisine ulaşamamış olmamıza karşın aynı genotiple yapılan farklı hücre ko-kültür çalışmaları irdelendiğinde;

Kranzer ve ark.'nın(222) bizim çalışmamızdaki genotiple benzer *cagA* ve *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeni ve insan dendritik hücreleri ile 2005 yılında yaptıkları çalışmada; bu hücrelerden IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-8, IL-12 ve IL-10 sitokinlerinin salınımının negatif kontrole göre oldukça yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir. Schmidt ve ark.'nın(20) 1. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile benzer genotipte fakat farklı hücreler ile 2010 yılında yaptıkları çalışmada; *cagA* ve *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninin AGS hücrelerinde yüksek

düzeylede IL-8 salınımını indüklediği saptanmıştır. Yine AGS hücreleri ve *cagA*, *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile Andres ve ark.'nın(172) 2011 yılında yaptıkları çalışmada; negatif kontrole göre bu hücrelerden salınan IL-8 düzeyinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir.

Salgado ve ark.'nın(223) 2002 yılında hayvan modeli yaptıkları çalışmada; klinik *H. pylori* izolatlarının lipopolisakaritlerinin verildiği farelerde 1. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile benzer genotipte olan *cagA* ve *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninin negatif kontrole göre fare dalak hücrelerinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyini yükselttiği saptanmıştır.

Biyopsi örneklerindeki sitokin ekspresyonlarının araştırıldığı ve bizim çalışmamıza aldığımız *H. pylori* 1. genotipin içerdiği gen bölgelerinden *cagA* ve *vacAs1* gen bölgelerini içermesi nedeniyle benzerlik gösteren Augusto ve ark.'nın(228) 2007 yılında yaptıkları çalışmada; *cagA* +, *vacAs1* *H. pylori* genotipinin biyopsi örneklerinde IL-8 ve TNF- $\alpha$ 'nın anlamlı düzeydeki ekspresyonlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Ulaşabildiğimiz literatür bilgileri ile çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerimizi değerlendirdiğimizde; *H. pylori* *cagA*, *vacAs1m2* gen bölgelerini taşıyan 1. genotipteki *H. pylori* kökeninin indüklediği proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtları genel olarak literatür bilgileriyle uyumluluk gösterirken IL-8 yanıtındaki şiddete bağlı olarak bu kökenin üretildiği hastaya ait histopatolojik bulguları incelersek; hastamız korpus mukozasında inaktif hafif derecede kronik gastrit, antrum mukozasında hafif derecede aktif, hafif derecede kronik gastrit ve lenfoid agregat varlığı tanısına sahiptir. Nitekim; deneylerimiz sonucunda elde ettiğimiz salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 düzeyleri ile uyumlu olarak hastamızdaki hem antrum hem korpus genelinde hafif şiddetteki gastrit tanısına karşın lenfoid agregat varlığı kronik bir *H. pylori* enfeksiyonunu düşündürürken, diğer genotiplere göre indüklenen şiddetli IL-8 yanıtı da kemokin olarak bölgeye nötrofil infiltrasyonu ve hastalığın ilerleyen sürecinde oluşan lenfoid agregat varlığı ile ilişkili olabilir.

Çalışmamıza aldığımız bir diğer farklı genotip olan *cagA*, *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan 2. genotip *H. pylori* kökeninin ko-kültürü sonucunda THP-1 hücresinden diğer genotiplere göre 2. sırada salınma neden olduğu IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 3. sırada salınma neden olduğu IL-10, 4. sırada salınma neden olduğu IL-8 negatif

kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur( $p<0,001$ ). IL-12 salınım düzeyi ise negatif kontrole göre anlamsızdı( $p>0,05$ ). Genotip 2'nin nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda ise ; proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 salınım düzeyi negatif kontrole göre anlamsız düzeydeydi( $p>0,05$ ).

Yaptığımız literatür araştırması sonucunda *cagA* ve *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinde oluşan sitokin yanıtları üzerine yapılan bir literatür bilgisine ulaşamamış olmamıza karşın aynı genotiple yapılan farklı hücre ko-kültür çalışmaları irdelendiğinde;

Kranzer ve ark.'nın(222) 2005 yılında yaptıkları çalışmada; 2. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile aynı genotipteki *cagA* ve *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninin ko-kültürü insan dendritik hücreleri ile yapılmış ve bu hücrelerden IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-8, IL-12 ve IL-10 sitokinlerinin salınımının negatif kontrole göre oldukça yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir.

Kim ve ark.'nın(229) 2011 yılında *cagA* ve *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* ATCC 49503 kökeni ve bizim hücrelerimizden farklı hücre olmakla beraber dendritik hücreler ile yaptıkları çalışmada ise; *H. pylori* ATCC 49503 kökeninden elde ettikleri VacA proteinin dendritik hücrelerde IL-1 $\beta$ , IL-12 ve TNF- $\alpha$  indüklediği belirlenirken, bir başka dendritik hücre modelinde ise VacA'nın *E. coli* LPS'leri ile kombine edilerek verildiğinde *E. coli* tarafından indüklenmiş olan IL-1 $\beta$ , IL-12 ve TNF- $\alpha$  sentezinin azaldığı, bunun da VacA'nın inhibitör etkisi sonucu geliştiği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızdan farklı olarak biyopsi örneklerindeki sitokin düzeyi ile genotip ilişkisinin incelendiği ve 2009 yılında bildirilen çalışmada bizim genotipe benzer *cagA* ve *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeni ile enfekte gastritli hastaların biyopsi örneklerinde IL-1 $\beta$  ve IL-8 ekspresyonlarının anlamlı olarak yüksek saptandığı bildirilmiştir(176)

Yine bizim çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarından farklı olan AGS hücrelerinde Genotip 2 (*cagA*, *vacAs1m1*) ile yapılan değişik çalışmalardan; Schmidt ve ark.'nın(20) 2010 yılında yaptıkları çalışmada 2. genotipimizdeki *H. pylori* kökenine benzer genotipteki *cagA* ve *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninin AGS hücrelerinde IL-8 salınımını indüklediği , Andres ve ark.(172) tarafından aynı genotipe sahip dört kökenden üçünde negatif kontrole göre IL-8 salınım düzeyinin

oldukça yüksek olduğu bildirilirken, bir kökende IL-8 salınımının indüklenmediği ve Sun ve ark.'nın(230) 2006 yılında bildirdikleri çalışmada ise *cagA*, *vacAs1am1* genotipine sahip *H. pylori* ATCC 49503 kökeninin ko-kültürde IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  salınımının kontrole göre arttığı belirlenmiştir.

Aynı genotiple yapılan deneysel hayvan modellenli çalışmalarda ise sitokin düzeyleri incelendiğinde; Supajatura ve ark.'nın(231) 2002 yılında yaptıkları çalışmada *H. pylori* ATCC 49503 kökeninden elde edilen VacA proteinin etkisiyle fare mast hücrelerinde IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin yükseldiği ve Salgado ve ark.'nın(223) 2002 yılında yaptıkları çalışmada ise *cagA* ve *vacAs1am1* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* ATCC 43504 kökeninin lipopolisakkaritleri (LPS) fareye verilmiş ve bu genotipin diğer genotiplere (*cagA-vacAs1bm2*, *cagA-vacAs2m2*, *cagA-vacAs1bm1*, *cagA+vacAs2m2*, *cagA+vacAs1bm2*, *cagA+vacAs1am1*) göre TNF- $\alpha$  salınımı az olmakla beraber negatif kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

İncelediğimiz literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerimizi değerlendirdiğimizde Tip 1 köken olarak da tanımlayabileceğimiz *H. pylori* *cagA*, *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan 2. genotipteki *H. pylori* kökeninin indüklediği proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtları genel olarak literatür bilgileriyle uyumluluk gösterirken sitokin düzeylerindeki farklılığa bağlı olarak bu kökenin üretildiği hastaya ait histopatolojik bulguları incelersek; hastamız korpus mukozasında hafif-orta derecede aktif orta derecede kronik gastrit, lamina propriada orta derecede eozinofil artışı, foveolar mukozada fokal komplet tip intestinal metaplazi tanısına sahiptir. Nitekim; çalışmamızdan elde ettiğimiz sitokin düzeyleri ve hastamızın korpus mukozasında kronik aktif gastriti destekleyen eozinofil artışı, ayrıca kronik *H. pylori* enfeksiyonlarının ilerleyen döneminde ortaya çıkan intestinal metaplazi tanısı daha virulan olarak bilinen Tip 1 kökenlerle ilişkili olarak *H. pylori*'ye bağlı ortaya çıkan gastrik patolojilerin şiddeti ile uyumludur.

Çalışmamıza aldığımız bir diğer farklı genotip olan *cagA*, *vacAs1m2* ve *babA2* gen bölgelerini taşıyan 3. genotip *H. pylori* kökeninin ko-kültürü sonucunda THP-1 hücresinden diğer genotiplere göre 3. sırada salınımına neden olduğu IL-8, 4. sırada salınımına neden olduğu IL-1 $\beta$ , 5. sırada salınımına neden olduğu IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 ise negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur( $p < 0,001$ ). IL-12

salınım düzeyi ise negatif kontrole göre anlamsızdı( $p>0,05$ ). Genotip 3'ün nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda ise ; diğer genotiplere göre 2. sırada salınımına neden olduğu IL-8 negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur( $p<0,001$ ). Proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 salınımı ise negatif kontrole göre anlamsız düzeydeydi( $p>0,05$ ).

Yaptığımız literatür araştırması sonucunda *cagA* ve *vacAs1m2* ve *babA2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinde oluşan sitokin yanıtları üzerine yapılan bir literatür bilgisine ulaşamamış olmamıza karşın aynı genotiple yapılan farklı hücre ko-kültür çalışmaları irdelendiğinde;

AGS hücreleri ile *cagA*, *vacAs1m2* ve *babA2* genotip ilişkisinde IL-8 düzeyinin araştırıldığı Andres ve ark.'nın(172) 2011 yılında bildirilen çalışmasında 6 *cagA*, *vacAs1m2* ve *babA2* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökeninden 5'inin negatif kontrole göre bu hücrelerden salınan IL-8 düzeyinin oldukça yüksek olduğu bildirilirken, bir kökende ise IL-8 salınımının indüklenmediği bildirilmiştir. Yine benzer hücrelerle benzer genotipin ilişkisinde IL-8 indüksiyonunun araştırıldığı bir başka çalışmada ise *cagA* ve *babA* gen bölgelerini taşıyan *H. pylori* kökenlerinin IL-8'i AGS hücrelerinde kısmi *cagPAI* taşıyan kökenlere göre indüklediği saptanmıştır(20).

Çalışmamızdaki in-vitro sitokin düzeyi belirleme yönteminden farklı olarak tasarlanmış olan Rad ve ark.'nın(43) 2002 yılında bildirdikleri çalışmada bizim çalışmamızda kullandığımız *cagA*, *vacAs1* ve *babA2* genotipine sahip *H. pylori* kökenleri ile enfekte gastrik biyopsi örneklerinde IL-8 ve TNF- $\alpha$  mRNA miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Yine farklı bir in-vitro yöntemle çalışmamızdan farklılık gösteren Wen ve ark.'nın(182) 2007 yılında bildirdikleri ve *H. pylori* virülans faktörlerinin ve gastrik mukozada enflamatuar genlerin ekspresyonu ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında; triple-pozitif olarak tanımladıkları *H. pylori* *cagA*, *vacAs1*, *babA2* gen bölgelerinin her üçünü birden taşıyan kökenler ve triple-negatif kökenler ile enfekte hastaları *H. pylori* negatif hastaların gastrik mukozalarında IL-1 RL2 reseptör ekspresyonları yönünden karşılaştırdıklarında hem triple-pozitif hem de triple-negatif hastalarda *H. pylori* negatif hastalara göre ekspresyonun yüksek olduğu saptanmış ve

gastrik mukozada enflamatuar yanıt ile *cagA*, *vacAs1* ve *babA* genlerinin ekspresyonlarının ilişkisi olmadığı bildirilmiştir.

Çalışmaya aldığımız diğer dört genotipten farklı olarak Genotip 3(*cagA*, *vacAs1m2*, *babA2*)'de *H. pylori* dış membran proteini olarak *babA2* olup, bu adezinin gastrik mukozadaki sitokin düzeylerinin değişikliklerinin hayvan modelinde incelendiği ve 2011 yılında Sugimoto ve ark.(215) tarafından bildirilen çalışmada; vahşi tip *H. pylori* 7.13 kökeni ve *H. pylori* 7.13 *oipA*, *babA* veya *alpA* mutantları ile gastrik mukozada IL-6 sitokin düzeyinin değişiklikleri araştırılarak, deneyler süresince vahşi tip 7.13'e göre 7.13 *babA* mutantlarla enfekte mongolian gerbillerde IL-6 düzeyinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu verilerini; *Baba*'nın daha şiddetli *H. pylori* enfeksiyonuna ve IL-6 düzeyinin artmasına neden olduğu ve bunun da *H. pylori*'nin indüklediği gastrointestinal hastalıkların gelişme riskini arttırabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

Ulaşabildiğimiz az sayıdaki literatür bilgisi doğrultusunda çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerimizi değerlendirdiğimizde *H. pylori* *cagA*, *vacAs1m2* ve *babA2* gen bölgelerini taşıyan 3. genotipteki *H. pylori* kökeninin indüklediği proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtları genel olarak literatür bilgileriyle uyumluluk gösterirken sitokin düzeylerindeki farklılığa bağlı olarak bu kökenin üretildiği hastaya ait histopatolojik bulguları incelersek; hastamız korpus mukozasında inaktif hafif derecede kronik gastrit, antrum mukozasında şiddetli derecede aktif orta derecede kronik gastrit, komplet tip intestinal metaplazi ve lenfoid agregat varlığı tanısına sahiptir. Nitekim; deneylerimiz doğrultusunda saptadığımız sitokin yanıtlarından araştırdığımız diğer sitokinlere göre daha kuvvetli IL-8 yanıt oluşmasının yanında, genel olarak hafif düzeyde oluşan sitokin yanıtına karşın hastamızda antrum mukozasındaki şiddetli aktif gastritle beraber *H. pylori* enfeksiyonlarının ilerleyen dönemlerinde saptanan gastrik patolojilerden lenfoid agregat varlığı ve intestinal metaplazi tanısı, bu tabloların ortaya çıkışında bakteriyel virulus faktörlerin dışında konak reseptörleri ve gen polimorfizmleri gibi konağa bağlı faktörlerin de etkisi olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca diğer genotiplerimizde bulunmayan ve *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelere bağlanarak primer virulus faktörü olan *CagA* proteinin hücreye enjekte edilmesinde oldukça önemli role sahip *babA2* gen bölgesini içermesi nedeniyle ilişkili olabileceğini de düşünmekteyiz.

Çalışmamıza aldığımız bir diğer farklı genotip olan *cagA* gen bölgesi içermeyen ve sadece *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan 4. genotip *H. pylori* kökeninin ko-kültürü sonucunda THP-1 hücresinden diğer genotiplere göre 2. sırada salınımına neden olduğu IL-8, 4. sırada salınımına neden olduğu IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, 5. sırada salınımına neden olduğu IL-1 $\beta$  ise negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur( $p<0,001$ ). IL-12 salınım düzeyi ise negatif kontrole göre anlamsızdı( $p>0,05$ ). Genotip 4'ün nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda ise ; IL-6 salınımının saptandığı tek genotip, ayrıca diğer genotiplere göre IL-8 salınımının en yüksek saptandığı genotip olup, IL-6 ve IL-8 açısından negatif kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur( $p<0,001$ ). Proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 salınımı ise negatif kontrole göre anlamsız düzeydeydi( $p>0,05$ ).

Yaptığımız literatür araştırması sonucunda yalnızca *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökenleri ile THP-1 ve nötrofile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinde oluşan sitokin yanıtları üzerine yapılan bir literatür bilgisine ulaşamamış olmamıza karşın aynı genotiple yapılan farklı hücre ko-kültür çalışmaları irdelendiğinde;

Kranzer ve ark.'nın(222) 2005 yılında yaptıkları çalışmada; 4. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile aynı genotipte olan ve yalnızca *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökeninin ko-kültürü her ne kadar insan dendritik hücreleri ile yapılmış olsa da, bu hücrelerden IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-8, IL-12 ve IL-10 sitokinlerinin salınımının negatif kontrole göre oldukça yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız hücrelerden farklı olarak AGS hücreleri kullanılsa da *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökeni ile Andres ve ark.(172) tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökeninin negatif kontrole göre bu hücrelerden daha yüksek IL-8 salınımına neden olduğu bildirilmiştir.

Salgado ve ark.'nın(223)2002 yılında hayvan modeli yaptıkları çalışmada da; klinik *H. pylori* izolatlarının lipopolisakkaritlerinin verildiği farelerde 4. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile aynı genotipte olan ve yalnızca *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökeninin negatif kontrole göre fare dalak hücrelerinden salınan TNF- $\alpha$  düzeyini oldukça yükselttiği saptanmıştır.



*H. pylori* ile enfekte kronik gastritli hastaların gastik biyopsi örnekleri ile 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise; *cagA* ve *vacAs/m* allelerini farklı şekillerde taşıyan *H. pylori* kökenleri ile yapılan ve aralarında 4. genotipimizdeki *H. pylori* kökeni ile aynı genotipte olan yalnızca *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan *H. pylori* kökeninin de bulunduğu çalışmada, gastrik mukozadaki TNF- $\alpha$  ekspresyonunun *H. pylori* *cagA* ve *vacA* gen bölgelerinden bağımsız olduğu bildirilmiştir(232).

Araştırdığımız literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerimizi değerlendirdiğimizde *H. pylori* yalnızca *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan 4. genotipteki *H. pylori* kökeninin indüklediği proenflamatuar sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  ve anti-enflamatuar sitokin IL-10 yanıtları genel olarak literatür bilgileriyle uyumluluk gösterirken sitokin düzeylerindeki farklılığa bağlı olarak bu kökenin üretildiği hastaya ait histopatolojik bulguları incelersek; hastamız antrum mukozasında şiddetli aktif, orta derecede kronik gastrit, lenfoid folikül varlığı tanısına sahiptir. Nitekim; çalışmalarımız sonucunda saptadığımız diğer sitokinlere göre daha kuvvetli IL-8 yanıtı oluşmasıyla beraber genel olarak hafif düzeyde oluşan sitokin yanıtı daha az toksijenik olduğu bilinen *H. pylori* *vacAs2m2* gen bölgesini taşıyan kökenlerde beklenen sitokin yanıtı ile uyumludur. Ancak hastamızda antrum mukozasındaki şiddetli aktif gastritle beraber enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde saptanan lenfoid folikül varlığının oluşmasında, birçok mekanizmanın rol aldığı *H. pylori* enfeksiyonlarına bağlı gastrik patolojilerin ortaya çıkışında bakteriyel virulans faktörlerle beraber aynı zamanda konağa bağlı genetik faktörlerin de rol almasının etkisiyle olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca her ne kadar *vacA* gen bölgesi tüm *H. pylori* kökenlerinde taşınmakla beraber ancak % 50 civarında üretilen aktif toksin gastrik patolojilerin oluşmasında önemli role sahiptir. Genotip 4'de saptadığımız diğer genotiplerimize göre nispeten daha zayıf sitokin yanıtına ve *vacAs2m2* gen bölgesinin daha zayıf toksin üretimi ile ilişkili olduğu bilinmesine karşılık bu kökenin üretildiği hastadaki histopatolojik durumun konak genetik faktörlerine bağlı olarak genotipe spesifik gelişebildiği ileri sürülen enflamatuar yanıtla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Genel olarak farklı düzeylerde olmakla birlikte tüm genotiplerin sitokin yanıtını indüklemesi ile ilgili sonucumuz literatür bilgileri ile uyumluluk gösterirken tüm genotiplerdeki Th1 yanıtının oluşmasında önemli role sahip olan IL-12 yanıtındaki

eksiklik genel literatür bilgilerinden farklı görülebilir. Ancak az sayıda da olsa IL-12 yanıtı saptanmayan çalışmalar da mevcuttur. Sakai ve ark.'nın(220) 2008 yılında yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte hastaların gastrik mukozasında IL-12 düzeyinde yükselme saptanmamıştır. Ayrıca Kao ve ark.'nın(233) 2006 yaptıkları çalışmada, başka bir gastrit etkeni olan *Acinetobacter lwoffii* ile karşılaştırıldığında *H. pylori* ile uyarılan dendritik hücreler tarafından salınan IL-12 düzeyinin önemli ölçüde daha düşük olduğu bildirilmiş ve zayıf immünojenik özellikteki *H. pylori*'den ziyade henüz tanımlanmamış salgılanan bir faktörün yanıtın inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise Obonyo ve ark.(234) *H. pylori* ile inoküle edilmiş dendritik hücrelerde aşırı IL-10 üretimine bağlı olarak IL-12 düzeyinde azalma saptadıklarını ve dendritik hücrelerin anti-IL-10 antikoru ile tedavisi sonucunda IL-12 düzeyindeki artışıyla IL-10'un IL-12 üzerindeki baskılayıcı etkisini doğruladıklarını bildirmişlerdir. Son yıllarda IL-10 ekspresyonundaki artışa paralel olarak görülen IL-12 ve IL-6 baskılanmasında sorumlu mekanizmanın, *H. pylori* gibi fukoz-eksprese eden patojenler tarafından DC-SIGN signalosome'larının aktif bir şekilde kontrol edilmesi olarak tanımlanmıştır(235). Çalışmamızda deneylerimiz sonucunda saptadığımız IL-12 yanıtındaki eksikliğe dönük verilerimiz az sayıda da olsa literatür bilgileri ile uyumludur. Nitekim; tüm genotiplerimizde saptadığımız IL-12 yanıtındaki eksikliğin yine tüm genotiplerimizde saptadığımız yüksek düzeylerdeki IL-10 yanıtına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler bize; *cagA* ve *vacAs2m2* gen bölgelerini içeren 5. genotip *H. pylori* kökeninin THP-1 hücre hattında IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 sitokinlerinin yanıtını en yüksek düzeyde indüklemesi ve kökenin üretildiği hastadaki *H. pylori*'ye bağlı gelişen gastrik patolojilerden sadece gastrit tanısının bulunması genotip-sitokin düzeyi ve histopatoloji ilişkisinde konak genetik faktörlerine bağlı olarak genotipe spesifik konak immün yanıtının şiddetinin farklı olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim *cagA* ve *vacAs1m1* gen bölgelerini taşıyan 2. genotip *H. pylori* kökeni ve *cagA*, *vacAs1m2* ve *babA2* gen bölgelerini taşıyan 3. genotip *H. pylori* kökeninin THP-1 hücre hattında IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve IL-10 sitokinlerinin yanıtını 5. genotipe göre daha düşük düzeylerde indüklemesine karşın bu kökenlerin üretildikleri hastalarda *H. pylori*'ye bağlı gelişen gastrik patolojilerden intestinal metaplazi tanısının bulunması genotip-sitokin düzeyi ve histopatoloji

ilişkisinde ileri sürülen konak genetik faktörlerine bağlı olarak genotipe spesifik konak immün yanıtının şiddetinin farklı olabileceği düşüncesini doğrulamaktadır.

Bu bağlamda *H. pylori* kaynaklı gastrik patolojilerin ortaya çıkış mekanizmalarında primer role sahip olan bakteriyel virulans faktörlerle birlikte immün sistem hücreleri ve bu hücrelerden salınan proenflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinlerin ilişkisi yapılan birçok prospektif-kohort temelli moleküler deneysel çalışmaların yanısıra deneysel hayvan modeli araştırmalara karşın halen önemini ve bilimsel araştırmalar için gizemini korurken, coğrafik konumu özellikle Batı (Avrupa) ve Doğu (Asya) coğrafik özelliklerini birlikte içermesi açısından birçok ülkeden farklılık gösteren ülkemizde bu coğrafik birlikteliğin çok önemli ve tipik bir prototipi olan İstanbul ve çevre popülasyonundan izole edilen *H. pylori* kökenleriyle yapılan farklı-genotip-sitokin düzeyi ve histopatoloji ilişkisi ile ilgili çalışmamız uluslararası düzeyde yapılan çok az çalışmalardan biri olması ve ülkemizden de bildirilen ilk çalışma olması nedeniyle *H. pylori* patogenezinde etken-konak ilişkisi yönünden çok önemli olduğunu düşünmekteyiz. Az sayıdaki farklı genotiple yapılan bu çalışma sonuçlarına göre genotip farklılığının sitokin düzeyi ile birlikte gastrik histopatolojik paterni etkilediği söylenebilir. Ancak farklı genotip-sitokin düzeyi-gastrik histopatoloji korelasyonunu net olarak tanımlayabilmek için çok daha fazla sayıda kökenlerle ve farklı genotiplerle çeşitli gastroduodenal patolojileri içeren, aynı zamanda konağa bağlı genetik faktörlerin (spesifik MHC I ve MHC II tipleri gibi) de incelendiği kapsamlı ve yeni seri çalışmaların prospektif olarak yapılması gerektiğine inanıyoruz.

## KAYNAKLAR

- 1) Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;**19(3)**:449-90.
- 2) Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2008;2:2223-37.
- 3) Sutton P, Mitchell H (2010). *Helicobacter Pylori in the Twentieth-century.* Erişim 2012. <http://books.google.com/>
- 4) Hunt R.H., Tytgat G.N (2003). *Helicobacter Pylori: Basic Mechanisms to Clinical Cure 2002.* Erişim 2012. <http://books.google.com/>
- 5) Yamamoto Y, Friedman H, Hoffman P (2002). *Helicobacter Pylori Infection and Immunity.* Erişim 2012. <http://books.google.com/>
- 6) Owen RJ (2010). *Helicobacter. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.*
- 7) Demiray E, Bekmen N. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Fagositoz. *Mikrobiyol Bül* 2008;42:177-184.
- 8) Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol* 2001;**50**:1021-1029.
- 9) Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007;**37(2)**: 112-117.
- 10) Makristathis A, Barousch W, Pasching E et al. Two enzyme immunoassays and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:3710-3714.
- 11) Atherton JC. The Pathogenesis of *H. pylori* Induced Gastro-Duodenal Diseases. *Annu Rev Pathol* 2006;**1**:63-96.
- 12) Bergman MP, Engering A., Smits HH., Van Vliet SJ. Et al. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable

- interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* 2004;**200**:979-90.
- 13) Crabtree, J. E., Covacci, A., Farmery, S. M et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995;**48**:41-5.
  - 14) Mohammadi, M., Nedrud, J., Redline, R., Lycke, N. & Czinn, S. J. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* 1997;**113**:1848-57.
  - 15) Sawai, N., Kita, M., Kodama, T. Et al. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun* 1999;**67**:279-85.
  - 16) Smythies, L. E., Waites, K. B., Lindsey, J. R., Harris, P. R., Ghiara, P. & Smith, P. D. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol* 2000;**165**:1022-9.
  - 17) Yamamoto, T., Kita, M., Ohno, T., Iwakura, Y., Sekikawa, K. & Imanishi, J. Role of tumor necrosis factor-alpha and interferongamma in *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol Immunol* 2004;**48**:647-54.
  - 18) Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S. et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006;**55**:775-81.
  - 19) Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med*. 2008;**47**(12):1077-83.
  - 20) Schmidt HM, Andres S, Nilsson C, et al. The cag PAI is intact and functional but HP0521 varies significantly in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia and Singapore. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;**29**(4):439-51.
  - 21) Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;**2**:92.
  - 22) Yamaoka Y (2008). *Helicobacter pylori: molecular genetics and cellular biology*. Erişim 2012. <http://books.google.com/>

- 23) Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;**10(4)**:720-41.
- 24) Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;**16 Suppl** 1:3-15.
- 25) Tünger Ö. *Helicobacter pylori* İnfeksiyonları. *İnfeksiyon Dergisi* 2008;**22(2)**:107-115.
- 26) Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Tuncer M, Kocazeybek B. Analysis of serum antibody profile against *H pylori* VacA and CagA antigens in Turkish patients with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol*. 2006;**12(42)**:6869-73.
- 27) Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2002;**2**:1643-7.
- 28) Yılmaz YA. *Helicobacter pylori*: mikrobiyolojik tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;**35**:182-186.
- 29) Uyanık MH, Aktaş O. *Helicobacter Pylori*'nin Mikrobiyolojik Tanısı. *The Eurasian Journal of Medicine*. 2007;**39**:205-209 .
- 30) Moran AP, Lindner B, Walsh EJ. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol*. 1997;**179(20)**:6453-63.
- 31) Liechti G, Goldberg JB. Outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, and *Helicobacter pylori*: paradigm deviations in *H. pylori*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;**2**:29.
- 32) Isami T, Takashi J, Katsushi W et al. Suppressive Effects of DNA Vaccines Encoding Heat Shock Protein on *Helicobacter pylori*-induced Gastritis in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;**277**:159-163.
- 33) Spohn G, Delany I, Rappuoli R and Scarlato V. Characterization of the HspR-Mediated Stress Response in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 2002; **184(11)**:2925–2930.
- 34) <http://www.hpylori.com.au/picturebook.html> Erişim 2013.
- 35) Johnson EM, Gaddy JA, Cover TL. Alterations in *Helicobacter pylori* triggered by contact with gastric epithelial cells *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;**2**:17.

- 36) Gaynor EC, Szymanski CM. The 30th anniversary of Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms workshops-what have we learned in three decades? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;**2**:20.
- 37) Lamb A, Chen LF. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *J Cell Biochem.* 2013;**114**(3):491-7.
- 38) KA Eaton, DR Morgan and S Krakowka. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 1989; **57**(4): 1119-1125.
- 39) O'Toole PW, Kostrzynska M, Trust TJ. Nonmotile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol. Microbiol.* 1994;**14**:691–703.
- 40) Mai UE, Perez-Perez GI, Allen JB, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J Exp Med.* 1992;**175**(2):517-25.
- 41) Segal ED, Shon J, Tompkins LS. Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. *Infect Immun.* 1992 May;**60**(5):1883-9.
- 42) Guruge, J. L., P. G. Falk, R. G. Lorenz, M. et al. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;**95**:3925–3930.
- 43) Rad, R., M. Gerhard, R. Lang, et al. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.* 2002;**168**:3033–3041.
- 44) Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;**97**:7533–7538.
- 45) Takata, T., E. El-Omar, M. Camorlinga, et al. *Helicobacter pylori* does not require Lewis X or Lewis Y expression to colonize C3H/HeJ. mice. *Infect. Immun.* 2002;**70**:3073–3079.
- 46) Mahdavi, J., T. Boren, C. Vandenbroucke-Grauls, and B. J. Appelmelk. Limited role of lipopolysaccharide Lewis antigens in adherence of *Helicobacter pylori* to the human gastric epithelium. *Infect. Immun.* 2003;**71**:2876–2880.

- 47) David J McGee, et al., *Helicobacter pylori* Thioredoxin Is an Arginase Chaperone and Guardian against Oxidative and Nitrosative Stresses. *J. Biol. Chem.* 2006;**281(6)**:3290-3296.
- 48) Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 1988;**26**:93–99.
- 49) Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:5791–5795.
- 50) Backert, S. and M. Selbach. "Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis." *Cell Microbiol* 2008;**10(8)**: 1573-81.
- 51) Cendron, L., M. Couturier, et al. "The *Helicobacter pylori* CagD (HP0545, Cag24) protein is essential for CagA translocation and maximal induction of interleukin-8 secretion." *J Mol Biol* 2009;**386(1)**: 204-17.
- 52) McClain, M. S., C. L. Shaffer, et al. "Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer." *BMC Genomics* 2009;**10**: 3.
- 53) Censini, S., C. Lange, et al. "cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93(25)**:14648-53.
- 54) Blomstergren, A., A. Lundin, et al. "Comparative analysis of the complete cag pathogenicity island sequence in four *Helicobacter pylori* isolates." *Gene* 2004;**328**: 85-93.
- 55) Hatakeyama, M. "Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein." *Nat Rev Cancer* 2004;**4(9)**:688-94.
- 56) Hatakeyama, M. "The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis." *Int J Hematol* 2006;**84(4)**:301-8.
- 57) Backert, S., E. Ziska, et al. "Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus." *Cell Microbiol* 2000;**2(2)**:155-64.



- 58) Odenbreit, S., J. Puls, et al. "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." *Science* 2000;**287**(5457):1497-500.
- 59) Muyskens, J. B. and K. Guillemin "Helicobacter pylori CagA Disrupts Epithelial Patterning by Activating Myosin Light Chain." *PLoS One* 2011;**6**(3):e17856.
- 60) Paziak-Domanska, B., M. Chmiela, A. Jarosinska, and W. Rudnicka. Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell. Immunol.* 2000;**202**:136–139.
- 61) Wang, J., E. G. Brooks, K. B. Bamford, T. L. Denning, J. Pappo, and P. B. Ernst. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J. Immunol.* 2001;**167**:926–934.
- 62) Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;**96**:14559–14564.
- 63) Sicinschi, L. A., P. Correa, et al. "CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions." *Clin Microbiol Infect* 2010;**16**(4): 369-78.
- 64) Murata-Kamiya, N. "Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*." *Microbes Infect.* 2011;**13**(10):799-807.
- 65) Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006;**11**(6):574-80.
- 66) Hatakeyama, M. "*Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis." *J Gastroenterol* 2009;**44**(4): 239-48.
- 67) Yamaoka, Y. "*Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration." *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**(9): 829-34.
- 68) van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, M. J. Blaser, and W. G. Quint. Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999;**37**:2306–2311.

- 69) Peek, R. M., G. G. Miller, K. T. Tham, G. I. Pe'rez-Pe'rez, X. M. Zhao, J. C. Atherton, and M. J. Blaser. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA\_ Helicobacter pylori* strains. *Lab. Investig.* 1995;**73**:760–770.
- 70) Hatakeyama, M. "[Oncogenic mechanism of *Helicobacter pylori*]." *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2008;**31(3)**: 132-40.
- 71) Monstein, H. J., A. Karlsson, et al. "Application of PCR amplicon sequencing using a single primer pair in PCR amplification to assess variations in *Helicobacter pylori* CagA EPIYA tyrosine phosphorylation motifs." *BMC Res Notes* 2010;**3**:35.
- 72) Backert, S., N. Tegtmeyer, et al. "The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis." *Helicobacter* 2010;**15(3)**: 163-76.
- 73) Selbach, M., S. Moese, et al. "Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*." *J Biol Chem* 2002;**277(9)**: 6775-8.
- 74) Hatakeyama, M. "SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis." *Curr Opin Microbiol* 2008;**11(1)**: 30-7.
- 75) Wen, S. and S. F. Moss " *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis." *Cancer Lett* 2009;**282(1)**:1-8.
- 76) Acosta, N., A. Quiroga, et al. "*Helicobacter pylori* CagA protein polymorphisms and their lack of association with pathogenesis." *World J Gastroenterol* 2010;**16(31)**: 3936-43.
- 77) Xu, S., C. Zhang, et al. "Effector prediction in host-pathogen interaction based on a Markov model of a ubiquitous EPIYA motif." *BMC Genomics* 2010;**11** Suppl 3: S1.
- 78) Terradot, L. and G. Waksman "Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system." *FEBS J* 2011;**278(8)**: 1213-22.
- 79) Truong, B. X., V. T. Mai, et al. "Diverse characteristics of the CagA gene of *Helicobacter pylori* strains collected from patients from southern vietnam with gastric cancer and peptic ulcer." *J Clin Microbiol* 2009;**47(12)**: 4021-8.

- 80) Higashi, H., R. Tsutsumi, et al. "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein." *Science* 2002;**295(5555)**: 683-6.
- 81) Reyes-Leon, A., J. C. Atherton, 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)**: 3445-54.
- 82) Sgouras, D. N., E. G. Panayotopoulou, et al. "CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children." *J Clin Microbiol* 2009;**47(8)**: 2426-34.
- 83) Queiroz, D. M., R. P. Cunha In Memoriam, et al. "*Helicobacter pylori* virulence factors as tools to study human migrations." *Toxicon*. 2010;**56(7)**:1193-7.
- 84) Fock, K. M. and T. L. Ang "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia." *J Gastroenterol Hepatol* 2010;**25(3)**: 479-86.
- 85) Murata-Kamiya, N., K. Kikuchi, et al. "*Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein." *Cell Host Microbe* 2010;**7(5)**: 399-411.
- 86) Salih, B. A., B. K. Bolek, et al. "DNA sequence analysis of cagA 3' motifs of *Helicobacter pylori* strains from patients with peptic ulcer diseases." *J Med Microbiol* 2010;**59(Pt 2)**: 144-8.
- 87) Argent, R. H., J. L. Hale, et al. "Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion." *J Med Microbiol* 2008;**57(Pt 9)**:1062-7.
- 88) Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;**99**:14428–14433.
- 89) Takata, S., M. Ito, et al. "Pathogenetic role of the tyrosine-phosphorylated CagA EPIYA sequence of *Helicobacter pylori* in histological gastritis in Japanese patients." *J Gastroenterol* 2009;**44(5)**: 405-11.

- 90) Xia, Y., Y. Yamaoka, et al. "A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*." *PLoS One* 2009;**4(11)**: e7736.
- 91) Jones, K. R., Y. M. Joo, et al. "Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer." *J Clin Microbiol* 2009;**47(4)**: 959-68.
- 92) Shokrzadeh, L., K. Baghaei, et al. "Analysis of 3'-end variable region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolated from Iranian population." *J Gastroenterol Hepatol* 2010;**25(1)**: 172-7.
- 93) Selbach, M., S. Moese, et al. "The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation." *EMBO J* 2003;**22(3)**: 515-28.
- 94) Kurashima, Y., N. Murata-Kamiya, et al. "Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence." *Int J Cancer* 2008;**122(4)**: 823-31.
- 95) Kwok, T., D. Zabler, et al. "Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation." *Nature* 2007;**449(7164)**: 862-6.
- 96) Jimenez-Soto, L. F., S. Kutter, et al. "*Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner." *PLoS Pathog* 2009;**5(12)**: e1000684.
- 97) Wessler, S. and S. Backert "Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*." *Trends Microbiol* 2008;**16(8)**: 397-405.
- 98) Marchetti, M., B. Arico, D. Burrioni, N. Figura, R. Rappuoli, and P. Ghiara. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995;**267**:1655–1658.
- 99) Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect. Immun.* 2001;**69**:730–736.
- 100) Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B et al. Differences in Genotypes of *Helicobacter pylori* from Different Human Populations. *Journal of Bacteriology*, 2000;**182(11)**:3210-3218.

- 101) Atherton, J. C., R. M. Peek, K. T. Tham, T. L. Cover, and M. J. Blaser. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;**112**:92–99.
- 102) Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;**96**:12778–12783.
- 103) Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, et al. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesion during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* 2001.**61**:1903–1909.
- 104) Go MF, Crowe SE. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North Am* 2000; **29**:649-671.
- 105) Yamaoka, Y., S. Kikuchi, H. M. el-Zimaity, O. Gutierrez, M. S. Osato, and D. Y. Graham. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002;**123**:414–424.
- 106) Şimşek İ, Binici Ö. *Helicobacter pylori*. *İç Hastalıkları Dergisi* 2011;**18**:13-26.
- 107) Chmiela M, Czkwianianc E, Wadstrom T, Rudnicka W. Role of *Helicobacter pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages. *Gut* 1997; **40**: 20-4.
- 108) BONTKES, H. J., VEENENDAAL, R. A., PENA, A. S., et al. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in patients with chronic active gastritis and duodenal ulcer. *Scand J Gastroenterol*, 1992;**27**, 129-33.
- 109) Bhat, N., Gaensbauer, J., Peek, R. M., et al Local and systemic immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* strains. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005;**12**:1393-400.
- 110) Kullavanijaya, P., Thong-Ngam, D., Hanvivatvong, O., Nunthapisud, P., Tangkijvanich, P. & Suwanagool, P. Analysis of eight different methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004;**19**:1392-6.

- 111) Blaser, M. J. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology*, 1992;**102**:720-7.
- 112) Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. İmir T editor. *İmmünoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık;2008.87-104.
- 113) Abbas AK, Lichtman AH. Camcıoğlu Y, Deniz G editor. *Temel İmmünoloji*. İstanbul:İstanbul Medya Yayıncılık; 2007.1-103.
- 114) Atherton, J. C. *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull*, 1998;**54**:105-120.
- 115) Allen LA. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis* 2001; **14**: 273-7.
- 116) Akhiani AA, Pappo J, Kabok Z, et al Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *J Immunol*. 2002 Dec 15;**169**(12):6977-84.
- 117) Mitchell HM, Ally R, Wade A, Wiseman M, Segal I. Major differences in the IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in the first and third worlds. *Scand J Gastroenterol*. 2002 May;**37**(5):517-22.
- 118) Meyer F, Ramanujam KS, Gobert AP, James SP, Wilson KT. Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J Immunol*. 2003 Oct 15;**171**(8):3913-7.
- 119) Byrne MF, Murphy JF, Corcoran PA, et al. *Helicobacter pylori* induces cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in vascular endothelial cells. *Scand J Gastroenterol*. 2003 Oct;**38**(10):1023-30.
- 120) Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. *Helicobacter pylori*-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun*. 2003 Apr;**71**(4):1755-62.
- 121) Sommer F, Faller G, Röllinghoff M, Kirchner T, Mak TW, Lohoff M. Lack of gastritis and of an adaptive immune response in interferon regulatory factor-1-deficient mice infected with *Helicobacter pylori*. *Eur J Immunol*. 2001 Feb;**31**(2):396-402.

- 122) Strober W, Kelsall B, Fuss I, et al. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today*. 1997 Feb;**18(2)**:61-4.
- 123) Chakravorty M, Ghosh A, et al. Interaction Between *IL1B* Gene Promoter Polymorphisms in Determining Susceptibility to *Helicobacter pylori* Associated Duodenal Ulcer *Human Mutation* 2006; **27(5)**,411-419.
- 124) Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Goksel S, Dirican A, Kocazeybek B. Role of host interleukin 1beta gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in clinical outcomes in *Helicobacter pylori*-positive Turkish patients with dyspepsia. *J Gastroenterol*. 2008;**43(9)**:705-10.
- 125) Queiroz DM, Guerra JB, Rocha GA, et al. *IL1B* and *IL1RN* polymorphic genes and *Helicobacter pylori* cagA strains decrease the risk of reflux esophagitis. *Gastroenterology* 2004;**127**:73-79.
- 126) Necula LG, Chivu-Economescu M, Stanciulescu EL, et al. IL-6 and IL-11 as markers for tumor aggressiveness and prognosis in gastric adenocarcinoma patients without mutations in Gp130 subunits. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2012 Mar;**21(1)**:23-9.
- 127) Nozawa, Y., Nishihara, K., Peek, R. M., et al. Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, . 2002;**64**: 21-30.
- 128) Ben Nasr, H., Chahed, K., Mestiri, S., Bouaouina, N., Snoussi, K. & Chouchane, L. Association of IL-8 (-251)T/A polymorphism with susceptibility to and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma. *Hum Immunol*, 2007;**68**: 761-9.
- 129) Gyulai, Z., Klausz, G., Tiszai, A., Lenart, Z., Kasa, I. T., Lonovics, J. & Mandi, Y. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw*, 2004;**15**:353-8.
- 130) Harrington, L. E., Mangan, P. R. & Weaver, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006;**18**:349-56.

- 131) Amedei, A., Cappon, A., Codolo, G., et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest*, 2006;**116**:1092-101.
- 132) Navaglia, F., Basso, D., Zambon, C. F., et al. Interleukin 12 gene polymorphisms enhance gastric cancer risk in *H pylori* infected individuals. *J Med Genet*, 2005;**42**:503-510.
- 133) Cutler, C. W., Jotwani, R. & Pulendran, B. Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? *Infect Immun*, 2001;**69**:4703-8.
- 134) HIDA, N., T. SHIMOYAMA, J., P. NEVILLE, et al. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. *J. Clin. Pathol*, 1999;**52**:658-664.
- 135) Chen Wangxue , D. Shu & Chadwick, V. S. Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2001;**16**: 377.
- 136) Zambon, C. F., Basso, D., Navaglia, F., et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine*, 2005;**29**:141-52.
- 137) Suerbaum S and Michetti P, *Helicobacter pylori* infections. *New Engl. J. M* 2002; **347**:1175–1186.
- 138) Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993;**22**(1):15-19.
- 139) Gürsan N. Gastritlerin Sınıflandırılması ve Derecelendirilmesi. *EAJM*: 2006;**38**:113-118.
- 140) Kılıçarslan H, Kalyon S, Yenice N. Peptik Ülser Etiyopatogenezi. *Okmeydanı Tıp Dergisi* 2011;**27**(2):65-69.
- 141) Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann. Intern. Med.* 1994;**120**:977–981.
- 142) Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Evaluation of two enzyme immunoassays for detecting *Helicobacter pylori* in



- stool specimens of dyspeptic patients after eradication therapy. *J Med Microbiol.* 2005 Sep;**54(Pt 9)**:863-6.
- 143) Kuipers, E. J., J. C. Thijs, and H. P. Festen. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995;**9(Suppl. 2)**:59–69.
- 144) Parsonnet J, GD Friedman, DP Vandersteen, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *NEJM*, 1991;**325**:1127-1131.
- 145) Kuipers EJ, Guillermo I Pérez-Pérez, Stephan GM Meuwissen, Martin J Blaser. *Helicobacter pylori* and Atrophic Gastritis: Importance of the cagA Status. *Journal of the National Cancer Institute*, 1995;**87(23)**:1777-1780.
- 146) Karasu Z, Akarca US. *Helicobacter pylori* ve gastrik kanser patogenezindeki rolü. *Güncel Gastroenteroloji* 2000;**4(1)**:8-21.
- 147) Ruiz B, Correa P, Foníham ETH, Ramaknshnan T. Antral atrophy, *Helicobacter Pylori*, colonization and gastric pH. *Am J Clin Pathol*, 1996;**105(1)**:96- 101
- 148) Houben GM, Stockbrügger RW. Bacteria in the aetio-pathogenesis of gastric cancer: a review. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1995;**212**:13-8.
- 149) Demiray M, Manavoğlu O. *Helicobacter Pylori* ve Gastrik Karsinogenez. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003;**29(2)**:29-33.
- 150) Bayerdorffer E, Neubauer A, Rudolph B, et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* 1995; **345**: 1591–1594.
- 151) Labenz J, Malfertheiner P. *H.pylori* in gastrooesophageal reflux disease: Causal agent, independent or protective factor? *Gut.* 1997; **41**:277-80.
- 152) Vicari J, Falk GW, Richter JE. *H.pylori* and acid peptic disorders of the esophagus: Is it conceivable? *Am J Gastroenterol.* 1997; **92**:1097-102.
- 153) Kocazeybek, Yuksel, Celik D, et al. Relationship between aneurysm and microorganism: Is *Helicobacter pylori* a primer agent or has an affinity to the tissue? *African Journal of Microbiology Research* 2013;**7(17)**:1723-1728

- 154) Ziver T, Yuksel P, Ipek G, et al. Aneurysm and *Helicobacter pylori* relationship: the seropositivity of CagA, VacA and other antigens of *Helicobacter pylori* in abdominal and ascending aortic aneurysms. *New Microbiol.* 2010 Jul; **33(3)**:233-42.
- 155) Kaklıkkaya İ, Kaklıkkaya N, Çubukçu K, Sönmez B, Kocazeybek B,; Koroner arter hastalığı ve *Helicobacter pylori*. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi.* 2001; **9**:142-144.
- 156) *Helicobacter pylori* Research Laboratory Websitesi , <http://.hpylori.com> Erişim 2013.
- 157) Saribas S, Kocazeybek B, Aslan M, et al. Do procalcitonin and C-reactive protein levels have a place in the diagnosis and follow-up of *Helicobacter pylori* infections? *J Med Microbiol.* 2004 Jul; **53(Pt 7)**:639-44.
- 158) Erzin Y, Aslan M, Dobrucalı A, Altun S, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Dispeptik hastalarda anti-*Helicobacter pylori* IgG ELISA kitinin *Helicobacter pylori* infeksiyonunun birinci tanısındaki etkinliğinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2007; **21**:3.
- 159) Kişioğlu S, Sarıbaş S, Aslan M, Karataş A, Altun S, Aygün S, Bağdatlı Y, Bal K, Atlas K, Kocazeybek B, *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının serolojik tanısında Western blot yönteminin değeri, *İnfeksiyon Dergisi* 2004; **18(4)**:467-472
- 160) Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Comparison of two different stool antigen tests for the primary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2004 Dec; **9(6)**:657-62.
- 161) Kocazeybek B, Memişoğlu R, Memişoğlu N, et al. *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının tanısında dışkıda antijen saptama ve tedavi sonrası *Helicobacter pylori* eradikasyonunun takibindeki rolü: *İnfeksiyon Derg* 2002
- 162) Howden CW, Hunt RH. Recommendation based on "Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* Infection". *Am J Gastroenterol* 1998; **93**: 2330-8.
- 163) Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; **133**: 985-1001.

- 164) Blum AL, Talley NJ, O'Morain C, et al. Lack of effect of treating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1875-81.
- 165) Vergara M, Catalán M, Gisbert JP, Calvet X. Meta-analysis: role of *Helicobacter pylori* eradication in the prevention of peptic ulcer in NSAID users. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; **21**: 1411-8.
- 166) Tytgat GNJ. Review article: treatments that impact favourably upon the eradication of *Helicobacter pylori* and ulcer recurrence. *Aliment Pharmacol Ther*. 1994 Aug; **8(4)**:359-68.
- 167) Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Feb; **16(2)**:167-80.
- 168) Malfertheiner P, F Megraud, C O'Morain, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. The European *Helicobacter* Study Group (EHS) *Gut* 2007; **56**:772-781.
- 169) Antos D, Schneider-Brachert W, Bästlein E, et al. 7-day triple therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and high-dose esomeprazole in patients with known antimicrobial sensitivity. *Helicobacter* 2006; **11**: 39-45.
- 170) Dore MP, Maragkoudakis E, Pironti A, Tadeu V, Tedde R, Realdi G, et al. Twice-a-day quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in the elderly. *Helicobacter* 2006; **11**: 52-5.
- 171) He Q, Wang JP, Osato M, Lachman LB. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct; **40(10)**:3720-8.
- 172) Andres S, Schmidt HM, Mitchell H, Rhen M, Maeurer M, Engstrand L. *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Mar; **61(2)**:168-78.
- 173) Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980 Aug; **26(2)**:171-6.

- 174) Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1979;**54(3)**:713-33.
- 175) Lehman N, Di Fulvio M, McCray N, Campos I, Tabatabaian F, Gomez-Cambronero J. Phagocyte cell migration is mediated by phospholipases PLD1 and PLD2. *Blood*. 2006;15;**108(10)**:3564-72.
- 176) Bartchewsky WJ, Martini R, Masiero M, 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)**:153-61.
- 177) Parsonnet J. Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ Health Perspect*. 1995;**103**Suppl 8:263-8.
- 178) Matysiak-Budnik T, Mégraud F. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2006;**42(6)**:708-16.
- 179) Straubinger RK, Greiter A, McDonough SP, et al. Quantitative evaluation of inflammatory and immune responses in the early stages of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun*. 2003;**71(5)**:2693-703.
- 180) Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JJ, et al. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut*. 1990 Feb;**31(2)**:134-8.
- 181) Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998 Jan 16;**279(5349)**:373-7.
- 182) Wen S, Velin D, Felley CP, Du L, Michetti P, Pan-Hammarström Q. Expression of *Helicobacter pylori* virulence factors and associated expression profiles of inflammatory genes in the human gastric mucosa. *Infect Immun*. 2007;**75(11)**:5118-26.
- 183) Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis*. 1996;**173(5)**:1171-5.

- 184) Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;**102(26)**:9300-5.
- 185) van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1998 Jul;**115(1)**:58-66.
- 186) el-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology*. 1995 Sep;**109(3)**:681-91.
- 187) Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; **55**:2111–2115.
- 188) Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, et al. Role of *Helicobacter pylori* CagA strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer* 2003; **103**:815–821.
- 189) Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology* 2001; **42**:1337-1348.
- 190) Hatakeyama M and Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 2006; **11(1)**:14–20.
- 191) Hamlet, A., A. C. Thoreson, O. Nilsson, A. M. Svennerholm, and L. Olbe. Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in cagA genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* 1999;**116**:259–268.
- 192) Beales, I. L. P., J. E. Crabtree, D. Scunes, A. Covacci, and J. Calam. Antibodies to CagA protein are associated with gastric atrophy in *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. 1996;**8**:645–649.

- 193) Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;**97**:1263–1268.
- 194) D'Elia MM, Montecucco C, de Bernard M. VacA and HP-NAP, Ying and Yang of *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation. *Clin Chim Acta*. 2007;**381**(1):32-8.
- 195) Shirasaka D, Aoyama N, Satonaka K, et al. Analysis of *Helicobacter pylori* vacA gene and serum antibodies to VacA in Japan. *Dig Dis Sci*. 2000 Apr;**45**(4):789-95.
- 196) Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol*. 2001 Feb;**158**(2):647-54.
- 197) Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect Immun*. 1995;**63**(5):1681-87.
- 198) Eskandari-Nasab E, Sepanjnia A, Moghadampour M, et al. Circulating levels of interleukin (IL)-12 and IL-13 in *Helicobacter pylori*-infected patients, and their associations with bacterial CagA and VacA virulence factors. *Scand J Infect Dis*. 2013 May;**45**(5):342-9.
- 199) Ramarao N, Gray-Owen SD, Meyer TF. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol Microbiol*. 2000 Oct;**38**(1):103-13.
- 200) Wu MS, Lin JT, Hsu PN, et al. Preferential induction of transforming growth factor-beta production in gastric epithelial cells and monocytes by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *J Infect Dis*. 2007;**196**(9):1386-93.
- 201) Roth KA, Kapadia SB, Martin SM, Lorenz RG. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J Immunol*. 1999 Aug 1;**163**(3):1490-7.

- 202) Eaton KA, Mefford M, Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J Immunol.* 2001 Jun 15;**166(12)**:7456-61.
- 203) Gobert AP, Cheng Y, Wang JY, et al. *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J Immunol.* 2002 May 1;**168(9)**:4692-700.
- 204) D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, et al. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol.* 1997 Jan 15;**158(2)**:962-7.
- 205) Israel DA, Peek RM. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Sep;**15(9)**:1271-90.
- 206) Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter.* 2007 Apr;**12(2)**:124-31.
- 207) Klausz G, Tiszai A, Tiszlavicz L, et al. Local and peripheral cytokine response and CagA status of *Helicobacter pylori*-positive patients with duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw.* 2003 Jul-Sep;**14(3)**:143-8.
- 208) Basso D, Scrigner M, Toma A, et al. *Helicobacter pylori* infection enhances mucosal interleukin-1 beta, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2. *Int J Clin Lab Res.* 1996;**26(3)**:207-10.
- 209) Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.* 1994 May;**29(5)**:425-9.
- 210) Goll R, Gruber F, Olsen T, et al. *Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptive immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa. *Helicobacter.* 2007 Jun;**12(3)**:185-92.
- 211) Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut.* 1997 Oct;**41(4)**:442-51.

- 212) Li N, Xu X, Xiao B, et al. H. pylori related proinflammatory cytokines contribute to the induction of miR-146a in human gastric epithelial cells. *Mol Biol Rep.* 2012 Apr;**39(4)**:4655-61.
- 213) Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut.* 2001 Jun;**48(6)**:765-73.
- 214) Isomoto H, Matsushima K, Inoue N, et al. Interweaving microRNAs and proinflammatory cytokines in gastric mucosa with reference to *H. pylori* infection. *J Clin Immunol.* 2012 Apr;**32(2)**:290-9.
- 215) Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Nov;**26(11)**:1677-84.
- 216) Odenbreit S, Linder S, Gebert-Vogl B, Rieder G, Moran AP, Haas R. Interleukin-6 induction by *Helicobacter pylori* in human macrophages is dependent on phagocytosis. *Helicobacter.* 2006 Jun;**11(3)**:196-207.
- 217) Takeshima E, Tomimori K, Teruya H, et al. Helicobacter pylori-induced interleukin-12 p40 expression. *Infect Immun.* 2009 Apr;**77(4)**:1337-48.
- 218) Characterization of the *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein A as a T-helper cell type 1 polarizing agent. Deml L, Aigner M, Decker J, et al. *Infect Immun.* 2005 Aug;**73(8)**:4732-42.
- 219) Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedobitek G, Lochs H, Schreiber S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clin Exp Immunol.* 1999 Aug;**117(2)**:316-23.
- 220) Sakai K, Kita M, Sawai N, et al. Levels of interleukin-18 are markedly increased in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa among patients with specific IL18 genotypes. *J Infect Dis.* 2008 Jun 15;**197(12)**:1752-61.
- 221) Chang LL, Wang SW, Wu IC, et al. Impaired dendritic cell maturation and IL-10 production following H. pylori stimulation in gastric cancer patients. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Oct;**96(1)**:211-20.



- 222) Kranzer K, Söllner L, Aigner M, et al. Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells. *Infect Immun.* 2005 Jul;**73(7)**:4180-9.
- 223) Salgado F, García A, Oñate A, González C, Kawaguchi F. Increased in-vitro and in-vivo biological activity of lipopolysaccharide extracted from clinical low virulence *vacA* genotype *Helicobacter pylori* strains. *J Med Microbiol.* 2002 Sep;**51(9)**:771-6.
- 224) Tanigawa T, Watanabe T, Higuchi K, et al. Lansoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Suppresses Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-1beta Induced by Lipopolysaccharide and *Helicobacter Pylori* Bacterial Components in Human Monocytic Cells via Inhibition of Activation of Nuclear Factor-kappaB and Extracellular Signal-Regulated Kinase. *J Clin Biochem Nutr.* 2009 Jul;**45(1)**:86-92.
- 225) Bodger K, Bromelow K, Wyatt JI, Heatley RV. Interleukin 10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. *J Clin Pathol.* 2001 Apr;**54(4)**:285-92.
- 226) Wiese M, Eljaszewicz A, Andryszczyk M, Gronek S, et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* and *Helicobacter pylori* CagA<sup>+</sup> on the expression of selected superficial molecules on monocyte and lymphocyte and the synthesis of cytokines in whole blood culture. *J Physiol Pharmacol.* 2012 Jun;**63(3)**:217-24.
- 227) de Bernard M, Cappon A, Pancotto L, et al. The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell Microbiol.* 2005 Feb;**7(2)**:191-8.
- 228) Augusto AC, Miguel F, Mendonça S, Pedrazzoli J Jr, Gurgueira SA. Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem.* 2007 Jun;**40(9-10)**:615-22.
- 229) Kim JM, Kim JS, Yoo DY, Ko SH, Kim N, Kim H, Kim YJ. Stimulation of dendritic cells with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin negatively regulates their maturation via the restoration of E2F1. *Clin Exp Immunol.* 2011 Oct;**166(1)**:34-45.

- 230) Sun J, Aoki K, Zheng JX, Su BZ, Ouyang XH, Misumi J. Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability. *World J Gastroenterol*. 2006 Apr 14;**12(14)**:2174-80.
- 231) Supajatura V, Ushio H, Wada A, et al. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J Immunol*. 2002 Mar 15;**168(6)**:2603-7.
- 232) Zalewska-Ziob M, Adamek B, Strzelczyk JK, et al. TNF-alpha expression in gastric mucosa of individuals infected with different virulent *Helicobacter pylori* strains. *Med Sci Monit*. 2009 Jun;**15(6)**:166-71.
- 233) Kao JY, Rathinavelu S, Eaton KA, Bai L, Zavros Y, Takami M, Pierzchala A, Merchant JL. *Helicobacter pylori*-secreted factors inhibit dendritic cell IL-12 secretion: a mechanism of ineffective host defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jul;**291(1)**:G73-81.
- 234) Obonyo M, Cole SP, Datta SK, Guiney DG. Evidence for interleukin-1-independent stimulation of interleukin-12 and down-regulation by interleukin-10 in *Helicobacter pylori*-infected murine dendritic cells deficient in the interleukin-1 receptor. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Aug;**47(3)**:414-9.
- 235) Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Geijtenbeek TB. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nat Immunol*. 2009 Oct;**10(10)**:1081-8.

**FORMLAR****Anamnez Formu**

Hastanın Adı:

Soyadı:

Protokol No:

Doğum yeri:

Doğum yerinde yaşama süresi:

Sigara kullanımı ve süresi:

Alkol kullanımı ve süresi:

Tel No:

Mide şikayeti:

Kronik hastalık:

Mide operasyonu geçmişi:

Daha önce *H. pylori* eradikasyon tedavisi hikayesi:

**KULLANDIĞI İLAÇLAR**

Aspirin:

Antibiyotik:

Mide İlacı:

Diğer:

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



Sayı: B.30.2.İST.0.30.90.00/4545

Konu:

Temel Tıp Bilimleri Bölümü  
Başkanlığına

İstanbul ...../...../.....

İLGİ: 11.01.2012 tarihli, 84 sayılı yazınıza:

09 Şubat 2012

Bölümünüze bağlı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Bekir KOCAZEYBEK'in danışmanlığında Doktora Öğrencisi Reyhan ÇALIŞKAN'ın yürüttüğü ve Prof.Dr.Kadir BAL,Doç.Dr.Yusuf ERZİN ile Yard.Doç.Dr.Ayça SAYI YAZGAN'ın yardımcı araştırmalarında "Genotipleri Farklı Helicobacter Pylori Kökenlerinin Nötrofil ve Monosit Hücre Kültürlerinde Oluşturduğu Sitokin Yanıtları" başlıklı doktora tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 07 Şubat 2012 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:  
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ  
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL  
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:ctfetik@istanbul.edu.tr.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Reyhan	Soyadı	Çalışkan Algıngil
Doğ. Yeri	SAMSUN	Doğ. Tar.	19-05-1978
Uyruğu	TC	TC Kim No	19982647882
Email	<a href="mailto:rcalskan@yahoo.com">rcalskan@yahoo.com</a>	Tel	0505 227 99 67

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. C.T.F. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	2013
Yük.Lis.	İ.Ü. C.T.F. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	2003
Lisans	İ.Ü. C.T.F. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1999
Lise	Çarşamba Lisesi	1995

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İ.Ü. C.T.F. Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	1999-Halen
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	73,75	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı		76	

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

## Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

## Uluslararası Yayınlar:

1. Kocazeybek B., Yuksel P., Çelik D.G., Balcı A, Abdelkareem A., Ergin S, Koksal V, Barış İ, Aslan M, Sarıbaş S, **Çalışkan R**, Cakan H, Ziver T, Kaygusuz A, Yekeler İ, Tokman H. B. Relationship between aneurysm and microorganism: Is Helicobacter pylori a primer agent or has an affinity to the tissue? *Afr J Microbiol. Res.* 2013;7(17);1723-28.
2. Aslan M, Kocazeybek B, Turan N, Karakose AR, Altan E, Yuksel P, Saribas S, Cakan H, **Caliskan R**, Torun MM, Balcioglu I, Alpay N, Yilmaz H Investigation of schizophrenic patients from Istanbul, Turkey for the presence of West Nile virus.. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2012 Mar;**262(2)**:173-7.
3. Yuksel P, **Caliskan R**, Ergin S, Aslan M, Celik DG, Saribas S, Ziver T, Yalciner A, Kocazeybek B. New approaches to in vitro diagnosis of hepatitis C infection a reason for post transfusion hepatitis: Diagnostic value of determination of hepatitis C virus core antigen. *Transfus Apher Sci.* 2011 Dec;**45(3)**:247-50.
4. Ergin S, Saribas S, Yuksel P, Zengin K, Midilli K, Adas G, Arıkan K, Aslan M, Uysal H, **Çalışkan R**, Öner YA, Küçükbasmacı Ö, Kaygusuz A, Torun MM, Kocazeybek B. Genotypic characterisation of Echinococcus granulosus isolated from human in Turkey. *Afr J. Microbiol Res* Vol.4 (7), pp. 551-555, April, 2010.
5. **Caliskan R**, Masatlioglu S, Aslan M, Altun S, Saribas S, Ergin S, Uckan E, Koksal V, Oz V, Altas K, Fresko I, Kocazeybek B. The relationship between arthritis and human parvovirus B19 infection. *Rheumatol Int.* 2005 Nov;**26(1)**:7-11.