



ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÖLGEMİZDEN İZOLE EDİLEN *HELICOBACTER*
PYLORI SUŞLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN TESPİTİ**

DR. ERKAN YULA

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FATİH KÖKSAL**

ADANA-2009



ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÖLGEMİZDEN İZOLE EDİLEN *HELICOBACTER*
PYLORI SUŞLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN TESPİTİ**

DR. ERKAN YULA

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FATİH KÖKSAL**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF.2007.LTP.1
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2009

TEŐEKKÖR

Uzmanlık eğitimin boyunca desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla danıştığım ve engin tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Fatih Köksal'a ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine, dönem boyunca aynı ortamı paylaştığım tüm çalışma arkadaşlarıma, tüm Anabilim dalı çalışanlarına ve sadece bu dönemde değil tüm hayatım boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşime, anne ve babama en derin sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Erkan YULA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	xii
ABSTRACT-KEYWORDS	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Tarihçe	2
2.2. Sınıflandırma	4
2.2.1 Doğal Ortamları	7
2.3. Morfolojik, Fizyolojik Özellikleri ve Antijenik Yapı	9
2.3.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri	9
2.3.2. Hücre Zarı, Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri	10
2.3.2.1. Lipopolisakkaritler	11
2.3.2.2. Lipit A	12
2.3.2.3. <i>H.pylori</i> 'nin Dış Zar Proteinleri	12
2.3.2.3.1. Porinler	12
2.3.2.3.2. Adhezinler	13
2.3.2.3.3. Hemaglutininler	14
2.3.2.4. Flagella	14
2.4. Genomik Özellikler	15
2.5. Kültür ve Üreme Özellikleri	17
2.6. Biyokimyasal Özellikleri	18
2.7. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılık	19
2.8. <i>Helicobacter Pylori</i> Enfeksiyonları	21
2.8.1. Enfeksiyonun Bulaşması	21
2.8.2. Patogeneze	22
2.8.2.1. Bakteriye Ait Virulans Faktörleri	23
2.8.2.1.1. Kolonizasyon Faktörleri	24
2.8.2.1.1.1. Hareket ve Flagella	24
2.8.2.1.1.2. Üreaz Enzimi	24
2.8.2.1.1.3. Adhezinler	25
2.8.2.1.2. Konak Savunmasından Korunma Faktörleri	25
2.8.2.1.2.1. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz	26
2.8.2.1.2.2. Thioredoksin (CD59)	26

2.8.2.1.3. Doku Hasarı Oluşturan Virulans Faktörleri	26
2.8.2.1.3.1. <i>cagA</i> Patojenite Adası ve <i>cagA</i> Geni	26
2.8.2.1.3.2. <i>vacA</i> Geni	28
2.8.2.1.3.3. <i>iceA</i> Geni	31
2.8.2.1.3.4. <i>babA</i> Geni	31
2.8.2.1.3.5. <i>oipA</i> Geni	32
2.8.2.1.4.6. Diğer Gen Bölgeleri	32
2.8.2.2. Hastaya Ait Faktörler	33
2.8.2.2.1. Doku Polimorfizmi	33
2.8.2.2.1.1. IL1 Sistemi	34
2.8.2.2.1.2. IL-1B Polimorfizmleri	34
2.8.2.2.1.3. IL-1RN Polimorfizmleri	35
2.8.2.2.1.4. <i>H.pylori</i> ile indüklenmiş gastrik patolojilerde IL-1 gen kümesinin ve çeşitli polimorfizmlerin rolü	37
2.8.2.2.1.5. Diğer sitokin gen polimorfizmleri	39
2.8.2.3. Çevresel Faktörler, Beslenme Alışkanlıkları ve Sigara	40
2.9. İmmünite	41
2.9.1. <i>H.pylori</i> 'ye karşı doğal immün cevapta polimorfizmin rolü	43
2.10. Yaptığı Hastalıklar	44
2.10.1. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları	44
2.10.1.1. Gastroözefajial Reflü Hastalığı	44
2.10.1.2. Gastrit	45
2.10.1.3. Mide Ülseri	45
2.10.1.4. Duodenal Ülser	46
2.10.1.5. Non-Ülser Dispepsi	46
2.10.1.6. Mide Kanseri ve MALT Lenfoma	47
2.10.2. Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar	47
2.11. <i>H.Pylori</i> Enfeksiyonlarında Tanı	48
2.11.1. Klinik Tanı ve Endoskopi	48
2.11.2. Mikrobiyolojik Tanı	49
2.11.2.1. Non-İnvaziv Testler	49
2.11.2.1.1. Serolojik Testler	49
2.11.2.1.1.1 Hasta Başı Yapılan Testler	50
2.11.2.1.1.2 Tükürük ve İdrarda Antikor Testleri	51
2.11.2.1.2. STRING Test	51
2.11.2.1.3. Üre Nefes Testi	51
2.11.2.1.4. Dışkıda Antijen Arayan Testler	52
2.11.2.1.5. Dışkıda Moleküler Tanı Testleri	53
2.11.2.2. İnvaziv Testler	53
2.11.2.2.1. Histopatolojik İnceleme	53
2.11.2.2.2. Kültürde İzolasyon	55
2.11.2.2.3. Hızlı Üre Testi	56
2.11.2.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	56
2.11.2.2.4.1. Amplifikasyon bazlı yöntemler	59
2.12. <i>H.Pylori</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	60
2.12.1. Genel Tedavi Yaklaşımları	60
2.12.2. Antibiyotik Direnci	62
2.13. <i>Helicobacter Pylori</i> Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	62

2.14. Korunma, Kontrol ve Aşı Çalışmaları	64
3. GEREÇ VE YÖNTEM	66
3.1. Hasta Seçimi ve Örneklerin Toplanması	66
3.2. Çalışma Dizaynı ve Uygulanan Moleküler Yöntemler	67
3.2.1. Biyopsi ve Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	69
3.2.2. Ekstrakte Materyalde DNA Miktarının Spektrofotometre ile Ölçülmesi	71
3.2.3. Pozitif Kontrol Suşunun Canlandırılması ve DNA Ekstraksiyonu	71
3.2.4. <i>H.pylori glmM (ureC)</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	71
3.2.5. <i>H.pylori cagA</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	72
3.2.6. <i>H.pylori vacA s1/s2</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	73
3.2.7. <i>H.pylori vacA m1/m2</i> Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	73
3.2.8. Konak Doku Polimorfizminin Belirlenmesi	74
3.2.8.1. <i>IL-1B</i> Geni -511 Bölgesinin Amplifikasyonu ve RFLP	74
3.2.8.1.1. Amplifiye Edilen Örneğin Eco88I RE Enzimi ile Kesilmesi	75
3.2.8.2. <i>IL-1B</i> Geni -31 Bölgesinin Amplifikasyonu ve RFLP	76
3.2.8.2.1. Amplifiye Edilen Örneğin AluI RE Enzimi ile Kesilmesi	77
3.2.9. <i>IL-1RN</i> Geninde Tekrar Eden Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	78
3.2.10. Amplifiye Edilen Ürünlerin Agaroza Jel Elektrophorezi	79
3.2.10.1. Elektrophorez Jelinin Hazırlanması	79
3.2.10.2. Amlikonların Agaroza Jele Yerleştirilmesi	80
3.2.10.3. Agaroza Jelin Görüntülenmesi	80
3.3. PCR İçin Kullanılan Sarf Malzemeler ve Solüsyonların Hazırlanması	80
3.3.1. PBS (Phosphate Buffer Saline) Hazırlanması	80
3.3.2. 10X TBE Solüsyonunun Hazırlanması	81
3.3.3. dNTP Karışımının Hazırlanması	81
3.3.4. DNA Markerların Hazırlanması	81
3.3.5. Yükleme Tamponunun Hazırlanması	81
3.3.6. Etidyum Bromit ile Boyama	82
3.3.7. Agaroza	82
3.3.8. Taq DNA Polimeraz	82
3.3.9. Primer Seçimi, Kontrolü ve Liyofilize Primerlerin Kullanımına Hazırlanması	82
3.4. İstatistiksel Analiz	83
4. BULGULAR	84
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	110
7. KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	133

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. <i>Helicobacter</i> 'lerin sınıflandırılması.	7
Tablo 2. Gastrik <i>Helicobacter</i> taksonomisi.	8
Tablo 3. Enterohepatik <i>Helicobacter</i> taksonomisi.	9
Tablo 4. Genom sekansı tamamlanan bazı <i>Helicobacter</i> türlerinin kıyaslanması.	18
Tablo 5. <i>Helicobacter</i> türlerinin karakteristik özellikleri	21
Tablo 6. <i>H.pylori</i> ilişkili hasarlıkların patogeneğinde çeşitli faktörler.	24
Tablo 7. <i>H.pylori</i> enfeksiyonu tanısında kullanılan testlerin genel özellikleri.	50
Tablo 8. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve hedef gen uzunlukları.	69
Tablo 9: Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin moleküler özellikleri.	69
Tablo 10: 1. Hasta grubunun demografik özellikleri, <i>H.pylori</i> prevalansı ve endoskopik bulgular.	86
Tablo 11: Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen <i>H.pylori</i> suşlarının cinsiyete göre dağılım oranları ve genotipik özellikleri.	89
Tablo 12: Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen <i>H.pylori</i> suşlarında <i>cagA</i> ile ilişkili <i>vacA</i> allellerinin prevalansı.	89
Tablo 13: <i>vacA</i> geninin s ve m alt tip kombinasyonlarının prevalansı.	89
Tablo 14: IL-1 polimorfizm durumunun cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılım oranları.	90
Tablo 15: Mide biyopsi örneklerinde en sık tespit edilen IL-1B 511 ve 31 kombinasyonları	91
Tablo 16: 1. Gaziantep hasta grubunun demografik özellikleri, cinsiyete göre yaş grupları ve endoskopik bulgular.	93
Tablo 17: <i>H.pylori</i> pozitif olduğu belirlenen Gaziantep bölgesine ait örneklerde <i>H.pylori</i> suşlarının cinsiyete göre genotip dağılım oranları.	93
Tablo 18: Gaziantep örneklerinde IL-1 polimorfizminin cinsiyete göre dağılım oranları.	94
Tablo 19: Gaziantep mide biyopsi örneklerinde en sık tespit edilen IL-1 511 ve 31 polimorfizm kombinasyonları.	94
Tablo 20: Kontrol kan grubu örneklerinde IL-1 polimorfizm prevalanslarının cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı.	95
Tablo 21: Kontrol kan grubu örneklerinde tespit edilen IL-1 polimorfizm kombinasyon İnsidansları.	95

Tablo 22. Çalışmaya dahil edilen tüm hasta gruplarında gastrit ve ülser patolojileri için risk analizi ve istatistiksel sonuçlar.	97
Tablo 23. Kontrol ve hasta grupları için risk analizi ve istatistiksel sonuçlar.	98

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. Enteropatik ve gastrik Helikobakter'lerin amidaz aktivitesi, <i>amiE</i> veya <i>amiF</i> gen varlığına ve 16S rRNA dizi analizine göre filogenetik ağacı.	8
Şekil 2: <i>IL-1B</i> ve <i>IL-1RN</i> genlerinin 2. kromozom üzerindeki yerleşim yerleri ve polimorfizmin <i>IL-1</i> sistemine etkisi.	37
Şekil 3. Çalışma Dizaynı; biyopsi örneğinin alınması, DNA izolasyonu ve hedeflenen konak ve bakteriyel gen bölgesi.	70
Şekil 4: Eco88I (AvaI) enziminin tanıma bölgesi.	76
Şekil 5. AluI restriksiyon enziminin kesim noktası.	78
Şekil 6: 294 bp'lik <i>glmM</i> amplikonunun % 1,8'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü.	86
Şekil 7: 349 bp'lik <i>cagA</i> amplikonunun % 1,8'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü.	87
Şekil 8: 259 bp (s1) ve 286 bp (s2) uzunluklarındaki amplikonların % 3'lük agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü	88
Şekil 9: 567(m1) bp ve 642(m2) bp'lik <i>vacA m</i> amplikonunun % 3'lük agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü.	89
Şekil 10: <i>IL-1B</i> -511 polimorfizmi, 155 bp uzunluğundaki amplikonun AvaI restriksiyon enzimi ile kesilmesi elde edilen DNA fragmanlarının % 2,5'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü.	91
Şekil 11: <i>IL-1B</i> -31 polimorfizmi, 239 bp uzunluğundaki amplikonun AluI restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile elde edilen DNA fragmanlarının % 2,5'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü.	92
Şekil 12: <i>IL-1RN</i> allelik polimorfizm, 86 bp'lik ardışık tekrar eden dizilerin PCR-VNTR ile elde edilen DNA fragmanlarının % 2'lik agaroz jelde UV ışığı altındaki görüntüsü.	92

KISALTMA LİSTESİ

Acetyl-CoA	Asetil Koenzim-A
AD	Agar Dilüsyon
ATCC	American Type Culture Collection
Bab	Blood Group Antigen Binding Adhesin
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
C	Sitozin
Cag	Cytotoxin Associated Gene
cagPAI	Cag Patojenite Adası
CD4	Helper T-lenfosit
CD8	Supressör T-lenfosit
CLO	Campylobacter-Like Microorganism
CO ₂	Karbondioksit
dATP	Deoksi adenin tri fosfat
dCTP	Deoksi sitozin tri fosfat
dGTP	Deoksi guanin tri fosfat
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
dTTP	Deoksi timidin tri fosfat
dUTP	Deoksi uridin tri fosfat
DÜ	Duodenal Ülser
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E-test	Epsilometrik test
ERK	Extracellular Signal-Related Kinase
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Floresan Insitu hibridizasyon testi
FlgE	Flagellin E
frxA	Flavin Oksidoredüktaz
Fts	Filamentation-Temperature-Sensitive
G	Guanin
G/MÜ	Gastrit ve/veya Mide Ülseri
GA	Güven Aralığı
GGT	Gamma-Glutamyl Transpeptidase
GlmM	Phosphoglucosamine Mutase

GK	Gastrik Kanser
GÖRH	Gastroözefajial Reflü Hastalığı
GRO- α	Büyüme (Growth) Faktörü alfa
HAP2	Hook associated protein 2, çengel ilişkili protein
H.pylori	Helicobacter pylori
hBD2	Human- β defensin 2
HOP	Dış membran proteini
HP	Helicobacter pylori
HPLC	High performance liquid chromatography
HP-NAP	Nötrofil adeziv protein
HPSA	H.pylori Dışkı (Stool) Antijeni
Hsp	Heat Shock Proteins - Isı Şok Proteinleri
HÜT	Hızlı Üreaz Testleri
IARC	International Agency for Research on Cancer Working Group
Ice	Inducible by Contact with Epithelium
IFAT	İmmün Floresan Antikor Testi
IFN	İnterferon
Ig	Immunoglobulin
IL	İnterlökin
IL1RN	IL-1 reseptör antagonist geni
INF- γ	İnterferon gamma
JNK	Jun N-terminal Kinase
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
LD	Linkage Disequilibrium
Le	Lewis
LPS	Lipopolisakkarid
M	Molar
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAP	Mitogen activated protein
MAPK	Mutasyonla Aktive Edilen Protein Kinaz
MAPs	Metil Kabul Eden Kemoreseptör Proteinleri
Mb	Mega baz
mm	Milimetre
MMP	Matriks Metalloproteaz
MMP	Metalloproteinaz.
MÜ	Mide Ülseri
MW	Moleküler ağırlık
n	Nano
N2	Nitrojen
NAAB	Nükleik Asit Amplifikasyon Bazlı
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

NF-κB	Nükleer Faktör kappa-B
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
NIH	National Institute of Health
NK	Natural Killer - Doğal katil hücreler
Nod	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOS	Nitrik Oksid Radikalleri
NSAİİ	Non Steroidal Anti İnflamatuvar İlaç
NÜD	Nonülser Dispepsi
O ₂	Oksijen
Oip	Outer Inflammatory Protein
OMP	Outer Membrane Protein – Dış Zar Proteinini
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
p	Piko
PAI	Patojenite adaları
PAI	Pathogenicity Islands - Patojenite Adaları
PAK	p21-Aktive Edilmiş Kinaz
PAMPs	patojene eşlik eden moleküler kalıpları
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-AFLP	PCR-Amplified Fragment Length Polymorphism
PCR-RFLP	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
Ph	Asidite Degeri
PMNL	Polimorfo Nüveli Lökosit
PPI	Proton Pompa İnhibitörü
PPK	Polifosfat Kinaz
PPV	Pozitif Prediktif Değer (Value)
PRRs	Patojen tanıma reseptörleri
Ptprz	Trozin fosfor reseptör tip Z
R/M	Restriksiyon metilasyon
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA.
Ras	Rasemaz
rdxA	Nitroredüktaz
RE	Restriksiyon endonükleaz
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Revolutions per minute
rpoB	RNA polymerase beta-subunit encoding geni
rRNA	Ribozomal RNA
RSKK	Refik Saydam Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR
sIgA	Sekretuvar İmmün Globulin-A

S.İ.Ü.	Sütçü İmam Üniversitesi
SNP	tek baz çifti mutasyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSA	Türe (Species) Spesifik Antijen
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Timin
T4SS	Tip 4 sekresyon sistemi
TBE	Tris Base, Borik asit, EDTA
Th1	T helper 1
TLR	Toll-like reseptör
TM	Melting point
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
ureA	üreaz A
UV	Ultra viole
ÜNT	Üre Nefes Testleri
Vac	Vacuolating Cytotoxin
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation – Dünya Sağlık Örgütü
y.y.	Yüz Yıl
μ	Mikron

ÖZET

Bölgemizden İzole Edilen *Helicobacter. pylori* Suşlarının Moleküler Epidemiyolojik Özelliklerinin Tespiti

Giriş ve Amaç: *Helicobacter pylori* (*H.pylori*), kronik olarak dünya nüfusunun yarısından fazlasını enfekte eden ve midede neoplastik ve inflamatuvar gastroduodenal hastalıkların major nedeni olan bir gastrik patojendir. Bakteri ve konak genetik faktörleri ile çevresel faktörler arasındaki kompleks etkileşimlerin, kişilerdeki farklı klinik sonuçların belirlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. *cagA* patojenite adası, *s1m1 vacA* alleleri, *babA2*, *sabA* ve *oipA*'yı içeren birçok bakteriyel virulans genleri, yüksek derecede mukozal inflamasyonla ilişkilidir. Aynı zamanda immün sistem de, *H.pylori* enfeksiyonuna inflamatuvar cevabın yoğunluğunu düzenleyerek gastroduodenal hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. *IL-1B*'da transkripsiyon başlangıç bölgesinden 511. ve 31. pozisyonlarda, hepsi Sitozin/Timin baz transizyonu sergileyen bazı biallelik polimorfizmler ile gastrik inflamasyonun derecesiyle ilişkili *IL-RN2* polimorfizmleri bildirilmiştir. Bununla birlikte farklı popülasyonlarda duodenal ülser, gastrit ve gastrik kanserle *IL-1B* polimorfizminin ilişkisiyle ilgili epidemiyolojik çalışmaların sonuçları bazı çelişkilere sahiptir. Bu çalışma, Çukurova bölgesinde, sitokin gen polimorfizmlerinin (*IL-1B*, *IL-1RN*) ve bakteriyel virulans markerlarının *H.pylori* enfeksiyonu süresince gastrointestinal hastalıkların gelişimindeki rolünü araştırmak için yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Gastrik semptomu olan 210 hasta ve 90 sağlıklı kontrolde, *IL-1B*'nın farklı lokusları ve *IL-1* reseptör antagonist (*IL-1RN*) genlerindeki polimorfizm, PCR-RFLP ile genotiplendirildi. Gastrik doku örneklerinde, *H.pylori* varlığı ve bakteriyel virulans markerları *glmM*, *cagA*, *vacAs1/2*, and *vacAm1/2* PCR ile araştırıldı.

Bulgular: *glmM*-PCR analizi sonucunda, 110 semptomatik hastanın 89 (% 80,9)'unda *H.pylori* DNA'sı tespit edildi. Kolonize suşların % 64'ünün Tip I suşlar olduğu ve Tip I ve Tip II suşlarda en çok görülen *vacA* allelik kombinasyonun 25 (% 28,0) suş ile *s1/m2* ve 23 (% 25,8) suş ile *s1/m1* olduğu belirlendi. Gastrit hastalarında, heterozigot *IL-1RN* 1/2 ve *IL-1B* C/T genotipleri daha sık oranda tespit edildi. *IL-1RN**2 genotipi taşıyıcılarının gastrit riskini 1,81 odds ratio ile bağımsız olarak artırdığı [% 95 güven aralığı (GA), 1,094–3,0], ($p=0,02$) ve *IL-1 RN L* allelinin gastrit riskini 0,168 odds ratio ile azalttığı [% 95 güven aralığı (GA), 0,039-0,725], ($p= 0,007$) bulundu. *IL-1B* (-511 ve -31 C/T) genotip/allelleri, gastroduodenal patoloji ile ilişkili bulunmadı.

Sonuç: *H.pylori* enfeksiyonunda sitokin gen polimorfizmi, gastrik inflamasyonu etkilemektedir. Bakteri virulans faktörleri ve sitokin genotipleri arasındaki etkileşim, farklı gastrik hastalıklara yol açan *H.pylori* enfeksiyonda muhtemelen ana yoldur. Yüksek riskli kişilerde, *H.pylori* eradikasyonunda bakteriyel testler ve konak genotiplerinin kombinasyonu hedef olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: *H.pylori*, *glmM*, *cagA*, *vacA*, *IL-1 β* polimorfizmi

ABSTRACT

Detection of Molecular Epidemiological Characteristics of *Helicobacter pylori* Strains Isolated From Cukurova Region

Background and aims: *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) is a gastric pathogen that chronically infects more than half of the world's population and the major cause of neoplastic and inflammatory gastroduodenal diseases of the stomach. It has been proposed that the complex interactions between the bacterial and host genetic factors, along with environmental factors, play a significant role in determining the differential clinical outcome among various individuals. Many bacterial virulence genes, including the pathogenicity island *cagA*, the *s1m1 vacA* alleles, *babA2*, *sabA* and *oipA*, have been associated with a higher degree of gastric mucosal inflammation. The immune system also plays an important role in the pathogenesis of gastroduodenal diseases by regulating intensity of the inflammatory response to *H.pylori* infection. Some biallelic polymorphisms have been reported in *IL1B*, all representing Cytosine/Thymine base transition at positions 511 and 31 from the transcriptional initiation site and *IL-RN*2* polymorphisms which are related with gastric inflammation degree. However, the results of epidemiological studies on the association of *IL1B* polymorphisms with duodenal ulcer, gastritis and gastric cancer in different populations are conflicting. The current study evaluated the role of cytokine gene (*IL-1B*, *IL-1RN*) polymorphisms and bacterial virulence markers on development of gastrointestinal diseases during *H.pylori* infection in the Cukurova region.

Materials and Methods: In 210 patients with gastric symptom and 90 healthy control group, polymorphisms at different loci of the *IL-1B*, and *IL-1* receptor antagonist (*IL-1RN*), were genotyped by PCR, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Presence of *H.pylori* and bacterial virulence factors was investigated by *glmM*, *cagA*, *vacAs1/2*, and *vacAm1/2* PCR from gastric tissue samples.

Results: In the result of *glmM*-PCR analysis, the presence of *H.pylori* DNA was detected in 89 (80,9 %) of the 110 symptomatic patients. Of colonized strains 64 % were *cagA*+*vacA*+ Type-I strains and the most *vacA* allelic combination seen in Type-I and Type-II strains was *s1/m2* with 25 (28 %) strains and *s1/m1* with 23 (25,8 %) strains. Heterozygous *IL-1RN* 1/2 and *IL-1B* C/T genotypes were more frequent than in gastritis patients. The carriage of *IL-1RN*2* independently increased the risk of gastritis, with odds ratio of 1,81 [95 % confidence interval (CI), 1,094–3,0], $p=0,02$ and the carriage of *IL-1 RN L* allele reduced the risk of gastritis with odds ratio of 0,168 [95 % confidence interval (CI), 0,039–0,725], $p=0,007$. *IL-1B* (-511 and -31 C/T) genotype/allele were not associated with gastroduodenal pathology.

Conclusion: Cytokine gene polymorphisms influence gastric inflammation in *H.pylori* infection. An interplay between bacterial virulence factors and cytokines genotypes, is probably the main route causing *H.pylori* infection to lead to different gastric diseases. A combination of bacterial testing and host genotyping may target the eradication of *H.pylori* to high-risk individuals.

Keywords: *H.pylori*, *glmM*, *cagA*, *vacA*, *vacA* alleles, *IL-1 β* polymorphism.

1. GİRİŞ

Helicobacter pylori, dünya nüfusunu en az % 50'sinin mide mukozasını enfekten ederek, gastrik ülserler, gastrik adenokarsinomalar, mukoza ile ilişkili lenfoid dokuda B hücre lenfomaları ve otoimmün gastrit gibi, gastroduodenal patolojilere yol açan önemli bir bakteriyel patojendir.^{1-3,4} İnsan ve bazı yüksek primatların mide mukozasına tropizm gösteren *H.pylori*, mikroaerofilik şartlarda üreyebilen gram negatif spiral şeklinde görünür. Mide mukozasında *H.pylori* ile ilişkili olarak ortaya çıkan histopatolojik değişimlerin prognozunu, CagA, VacA, Bab, IceA ve Lewis gibi antijen ve toksinlerdeki polimorfizm gibi bakteriye ait faktörler, ailedeki nüfus, beslenme alışkanlıkları, ve hijyenik şartlar gibi çevresel faktörler ile yaş, cinsiyet, ve proinflatuvar sitokin *IL1 β* ve *IL1RN* genlerindeki allelik polimorfizm gibi konağa ait faktörlerin birlikte etkileşiminin belirlediği ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada *H.pylori* kolonize hastalarda; mide mukozasında bakteri kolonizasyon sıklığı, kolonize suşlarda birçok çalışmada önemli oldukları ispatlanan *cagA* ve *vacA* genleri ve allelleri (*cagA*, *vacAs1-2*, *vacAm1-2*)'nin dağılımı ve hastaya ait *IL1 β* (-31 ve -511) ve *IL1RN* (VNTR) gen polimorfizmlerinin, tek başlarına ve birlikte prognoza olan etkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

Bu amaçla Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi, Kahramanmaraş S.İ.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi ve Sağlık Bakanlığı Adana hastaneleri gastroenteroloji polikliniklerine, herhangi bir gastroduodenal yakınmaları sebebi ile başvuran ve endoskopi endikasyonu alarak tanı amaçlı gastrik biyopsi örnekleri alınan hastaların doku materyalleri değerlendirilmiştir. Ayrıca hem konağa ait allelik polimorfizmin tek başına taşıdığı muhtemel riski belirlemek hem de toplumdaki allelik polimorfizm oranlarını tespit edebilmek için sağlıklı asemptomatik kan donörlerinden alınan serum örnekleride *IL1 β* (-31 ve -511) ve *IL1RN* (VNTR) genlerindeki allelik polimorfizm araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

H.pylori, enfekte insanların % 85-95'inde her hangi bir klinik yakınmaya yol açmadan midenin antrum ve/veya korpus bölgelerinde, mukus tabakası içerisinde glikozillenmiş yapılara bağlanarak, kolonize olur. Ancak kolonize olguların % 5-15'inde henüz kesinleştirilememiş ve muhtemelen konağa ait sebeplerle gastrik mukus içerisinden gastrik epitel yüzeyine ve oksintik kanalların içerisine göç eder. Mide mukoza yüzeyi ile temas sonucu, PMNL, B ve T hücreler, histiyositler ve doğal katil (NK) hücrelerin inflamasyonu ile karakterize patolojik bağışık cevaba, oksintik kanallardaki pariyetal hücrelerinde asit sekresyonlarında düzensizliklere yol açar. İnflamatuvar cevabın ve asit sekresyonundaki düzensizliğin şiddeti ve süresi, gastrik mukozadaki akut inflamasyondan adenokarsinomaya kadar değişen lokal histopatolojik değişimlerin belirleyicisidir.^{2,3} Diğer taraftan *H.pylori* enfeksiyonuna bağlı olarak antrumda görülen atrofik gastrit sonucu B vitamini emiliminin azalması, kanamasız ülser gibi sistemik hastalıkların ortaya çıkmasınada yol açmaktadır.²⁻⁵

2.1. Tarihçe

H.pylori ve diğer gastrointestinal ve enterohepatik helikobakterlerin biyolojinin ilk canlı organizmaları kadar eski oldukları ve insanlığın evrimsel olarak ayrımına uğradığı yıllardan çok daha önceki dönemlerde (tahminen 100 milyon yıl) ilk primatlarda ve büyük memelilerin gastrointestinal sistemlerine major flora bakterisi olarak yerleştikleri tahmin edilmektedir.^{5,25}

Ancak bu mikroorganizmaların invitro şartlardaki üretilme gücü, biyolojik özelliklerinin tanımlanması ve enfeksiyon hastalıklarla ilişkilerinin tespitini 20. yy. son çeyreğine kadar gecikmiştir.

İnsan mide biyopsi örneklerini histopatolojik yönden değerlendiren patolog Robin Warren ve Perth'in (1979) doku yüzeyindeki mukus katmanları arasında spiral şeklindeki bakterileri fark etmeleri ve hemen ardından R.Warren ile aynı hastanede çalışan iç hastalıkları uzmanı olan Barry Marshall'ın *in-vitro* şartlarda ürettikleri bu

bakterilerle gastrik ülser arasındaki ilişkiyi tespitiye yönelik klinik ve histopatolojik çalışmalarda elde etikleri bilgileri 1983 yılında Lancet dergisinde yayınlayarak helikobakterleri tıp ve bilim dünyasına tanıştırmışlardır.⁴ Gastroduodenal hastalıklarla, daha sonra *H.pylori* olarak adlandırılacak olan “spiral şekilli “ mikroorganizma arasındaki ilişkinin gösterilmesi 20. yy. tıbbına damgasını vuran önemli gelişmelerden birisidir.^{6,7}

Ancak *H.pylori*’nin gastrik mukozada sebep olduğu hastalıklara karşı tıbbın ilgisi yazılı tarih kadar eskidir. Özellikle 19. yüzyılın sonları ile 20. yy. başlarında Avrupa’da birçok patolog gastrik mukozadaki spiral şeklindeki bakterileri tanımlamışlardır. Örneğin mide ülseri ile bir bakteri arasındaki muhtemel ilişkiye ilk olarak dikkat çeken Bottcher G ve Letulle M (1875), mide biyopsi örneklerinde ülser tabanında ve kenarlarında gördükleri bakterilerin lezyonla ilişkili olabileceklerini iddia etmişlerdir. Klebs C (1881), gastrik lümende serbest olarak ve gastrik gland hücrelerinin arasında ve tunica propriada basillus benzeri organizmanın varlığını bildirmiştir. Jaworski W (1889), otopsi yapılan kişilerin mide yıkantı sularının sedimentinde spiral şekilli organizmaları ayrıntılı olarak tanımlamış, bunların diğer basillerden farklı olarak, düzenli sarmallar şeklinde olduklarını belirterek, gastrik patoloji ile ilişkili olduklarını söylediği bu bakterileri *Vibrio regula* olarak adlandırmıştır. Bu sebeple W. Jaworski gastroduodenal hastalıklar konusunda “bir öncü” olarak kabul edilebilir. Bizzozero G (1893) köpeklerin gastrik mukozasında, gastrik glandları infiltre eden, sitoplazma içerisinde ve parietal hücre vakuollerinde bulunan, spiral bakterilerin varlığını tanımladı. Bu mikroorganizma 1996 yılında *Helicobacter bizzozeronii* olarak adlandırılmıştır. Salomon H. (1896) kedi ve köpeklerin midelerinde kolonize olan spirallerin deneysel olarak farelere transferini gerçekleştirmiş böylece günümüzde denemeleri süren aşı çalışmalarına ışık tutmuştur. Krienitz W, 1906 yılında gastrik kasinoması olan insanların mide örneklerinde spiral organizmaları göstererek Jaworski’nin hipotezini desteklemiştir. Doenges JL (1938) bu bakterilerin *Macacus* maymunlarında varlığını göstermiş ve otopsi yapılan insanların % 40’ında midesinde bulunduğunu bildirmiştir. Freedberg AS ve Baron LE (1940) peptik ülserli veya karsinomali hastalardan gastrektomi ile elde edilen taze biyopsi örneklerinin % 37’sinde benzer organizmaların görüldüğünü bildirmişlerdir. Fakat bütün bu çalışmalar sadece hipotez aşamasında kalmıştır.

Barry Marshall ve R. Warren gastrik biyopsi örneklerinin histolojik incelemenmesi esnasında gördükleri basillerin, gram negatif kıvrımlı vibriolara benzemeleri sebebi ile bakterinin izolasyonu için kampilobakter türlerinin izolasyonunda kullanılan yöntemleri kullanmışlardır. Selektif besiyerlerine ekilen biyopsi örneklerini mikroaerofilik şartlarda, kampilobakter türleri için geçerli olan 48 saat inkübasyona bırakmışlardır. İlk yaptıkları 30 kültür denemesi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Ancak şans eseri, Paskalya tatili nedeniyle, kültürlerden birisi 5 gün süre ile inkübe edilmek zorunda kalmış ve süre sonunda besiyerinin yüzeyinde spiral şeklindeki mikroorganizmalara ait gözle görünür koloniler oluşmuştur.⁶ Bu keşiften sonra 11 hastanın daha biyopsi örneklerinde spiral mikroorganizmaları üreten araştırmacılar, bakterilerle gastrik mukozada kronik süperfisial gastrit ile uyumlu infamasyonun ve özellikle de kronik aktif gastrit için karakteristik olan PMNL infiltrasyonunu birlikteliğini vurgulayarak, spiral şekilli bu bakterilerle gastroduodenal patoloji arasında ilişkili olduğunu açıkça ortaya koymuşlardır. Biyopsi örneklerinden elde ettikleri histopatolojik verilerle de yetinmeyen Marshall ve arkadaşları (1985) ile Morris ve Nicholson (1987), kültür ortamında ürettikleri *H.pylori* suşlarını sıvı gıdalar ile yutarak, Koch postulatını gerçekleştirmişlerdir. Her iki araştırmacıda da 15 gün içerisinde gastrik ağrı ve yanma şikayetlerinin arttığı, gastik biyopsi örneklerinde de akut inflamatuvar cevabın başladığı tespit edilmiştir. Klinik ve histopatolojik bulgular her iki araştırmacıda da akut yüzeysel gastrit ile uyumlu tablonun geliştiği göstermiştir. Bu çalışmalar Marshall ve Warren'e 2005 yılında "Nobel Tıp" ödülü kazandırmıştır.⁸⁻¹⁰

B J Marshall ve R.Warren'in 1983 yılındaki yayınlarından sonra yapılan çok sayıdaki çalışma sonunda, *H.pylori* biyolojisi, *H.pylori* ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki ilişkinin fizyopatolojik ve histopatolojik karakteristiği ile *H.pylori* enfeksiyonlarının tedavisi konusundaki klasik bilgi ve uygulamaların birçoğu tamamen değişmiştir.¹¹⁻¹⁴

H.pylori'nin *in-vitro* şartlarda üretilmesi ile birlikte ilk çalışmalar bakterinin biyolojik özellikleri ve taksonomisine yönelik olarak yoğunlaşmıştır. Kültürde üretilen kolonilerden yapılan identifikasyon çalışmalarında bakterinin, morfolojik özellikleri ile kampilobakterlere benzemesi, bunların "*Campylobacter*-like microorganism (CLO)" ve *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırılmalarına sebep olmuştur.⁴ Ancak 16S rRNA'sının dizi analizi çalışmaları, nükleik asit hibridizasyon profilleri, büyüme

özellikleri, yağ asidi profilleri ve enzimatik aktivitelerinin tespitine yönelik çalışmalar sonunda bu mikroorganizmaların *Campylobacter*'lerden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bunun üzerine Goodwin (1989), benzer fenotipik özelliklere sahip olmasına rağmen bu bakterilerin, *Campylobacter*, *Flexispira* ve *Wolinella* cinslerinden farklı bir cinse ait olduğunu bildirmiştir. Aynı yıl, bakterinin helikal şeklinden ve sıklıkla midenin pilor bölgesinden izole edilmesinden ötürü yeni bir cinse ait olduğu tespit edilerek bu yeni cins "*Helicobacter*" olarak tanımlanmış ve *Campylobacter pylori* ismi, *Helicobacter pylori* olarak değiştirilmiştir.¹⁵ İsimlendirmede yeni bilgilerin ışığında değişim sürerken McNulty ve arkadaşları (1989), gastrik inflamasyonu olan hastalarda spiral şekilli bakteri yükünün eritromisin ve bizmut sitrat gibi antimikrobiyallerle tedavi sonrasında düşürüldüğü bildirerek, gastroduodenal hastalıkların tedavisinde antimikrobiyal kullanımının önemini vurgulamıştır.¹⁶ *H.pylori* biyolojisine ışık tutan tüm genomunun dizi analizi 1994 yılında yapılmış, elde edilen bilgiler hem sınıflandırma çalışmalarına hemde virulansın tespitine yönelik ileri moleküler çalışmaların önünü açmıştır. Genomik bilgilerin ışığında yapılan 16S RNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter* ve *Wolinella*'ların *rRNA* süperfamilya IV'e ait oldukları gösterilmiş, 16S rDNA bazlı filogenik analizler ile *Helicobacter* ve diğer cinsler Proteobacteria'lar epsilon alt sınıfına yerleştirilmişlerdir¹⁷ (Tablo 1).

H.pylori'nin gastroduodenal hastalıklarla ilişkisinin gösterilmesine yönelik çalışmalarda, bakterinin gastrik kolonizasyonu ile MALT ve gastrik adenokarsinomalar lenfoma arasındaki ilişki dikkat çekmiş ve 1991 yılında 4 farklı çalışmada eradikasyon tedavisi sonrası MALT lenfoma olgularında remisyon gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü'nün bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (International Agency for Cancer Research) 1994 yılında *H.pylori*'nin insanlar için kanserojen olduğunu ilan ederek, ilk defa bir bakteriyi Tip I karsinojen olarak sınıflandırmıştır.¹⁸⁻²¹ Aynı yıl National Institute of Health (NIH) konsensusunda *H.pylori*'nin peptik ülser hastalığının en önemli nedeni olduğunu bildirilmiş ve ülserli hastalarda bu mikroorganizmanın eradikasyonu için antibakteriyel tedavi rejimleri önermiştir.²²

2.2. Sınıflandırma

Helicobacteraceae ailesi içerisinde yer alan mikroorganizmaların, “*Helicobacter*” olarak tanımlanan bir cinsi bulunmaktadır (Tablo.1). Helikobakter cinsi içerisinde, 5’i ileri analizleri devam eden ve isimlendirme aşamasında olan olmak üzere tanımlanmış en az 46 tür yer almaktadır. Ayrıca 16S rDNA çalışmaları ile tiplendirilmeyi bekleyen yine en az 100 türde cins içerisinde dahil edilmeyi beklemektedir. (Tablo.1)

Tablo 1. Helikobakter’lerin sınıflandırılması

Alem, (Domain / empire):	"Bacteria"
Şube, (Division / phylum):	"Proteobacteria"
Sınıf, (Class):	"Epsilon proteobacteria"
Takım, (Order):	"Campylobacterales"
Aile, (Family):	"Helicobacteraceae"
Cins, (Genus):	"Helicobacter"

Helicobacteraceae cinsi içerisinde yer alan türlerin çoğu konak ve doku tropizmi gösterir (Tablo 2). Türler arasındaki tropizm ve 16S rRNA dizi farklılıkları dikkate alınarak helikobakter cinsi içerisindeki mikroorganizmalar; gastrik türler ve enterohepatik türler olarak iki büyük gruba ayrılırlar (Şekil1, Tablo 2 ve Tablo 3).

Doğada kedi, köpek, domuz ve kemiriciler gibi birçok farklı hayvan türünde farklı intestinal helikobakter türü tanımlanmış ancak en sık görülen helikobakter türlerinin *Gastrosphilium hominis* veya *H.heilmannii* olduğu bildirilmiştir.^{23,24} İnsanların gastrik mukozasına en iyi uyum sağlamış olan tür "*Helicobacter pylori*"dir. Daha az sıklıkta *H.heilmannii*, *H.salomonis*, *H.canis*, *H.pullorum*, *H.cinaedi*, *H.fennelliae*, *H.canadensis*, *H.winghamensis*, *H.westmeadi* ve *H.rappini* gibi enterohepatik helikobakter türleride oldukça düşük oranlarda insanlardan izole edilmiştir.²⁵ *H.pylori* dışında gastrik türlerden *H.heilmannii* ile enterohepatik türlerden *H.cinaedi* ve *H.fennelliae*’nin gastrite, homoseksüel erkeklerde enterit ve proktokotite, bazen de immün yetmezlikli hastalarda bakteriyemilere yol açabildiği bildirilmiştir. Yine enterohepatik türlerden *H.pullorum*, *H.canadensis* ve *H.winghamensis*’in insanlarda gastroenterit oluşturduğu tespit edilmiştir.⁴



Şekil 1. Enteropatik ve gastrik *Helicobacter*'lerin amidaz aktivitesi, *amiE* veya *amiF* gen varlığına ve 16S rRNA dizi analizine göre filogenetik ağacı.²⁶

Tablo 2. Gastrik *Helicobacter* taksonomisi

Tür	Doğal Konak	Suş/Klon	GenBank 16S rRNA Erişim No
<i>H. acinonychis</i>	Çıta	ATCC 51101 ^T	M88148
<i>H. bizzozeronii</i>	Köpek	CCUG 35545 ^T	Y09404
<i>H. felis</i>	Kedi, köpek	ATCC 49179 ^T	M37642
<i>H. mustelae</i>	Ferret	ATCC 43772 ^T	M35048
<i>H. nemestrinae</i>	Pigtailed maymunu	ATCC 49396 ^T	X67854
<i>H. pylori</i>	İnsan, rhesus maymunu	ATCC 43505 ^T	M88157
<i>H. salomonis</i>	Köpek	CCUG 37845 ^T	U89351

ATCC: American Type Culture Collection; T, type strain; CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Dept. of Clinical Bacteriology, Göteborg, Sweden.

Tablo 3. Enterohepatik *Helicobacter* taksonomisi

Tür	Doğal Konak	Suş/Klon	GenBank 16S rRNA erişim no
<i>H. aurati</i>	Hamster	ATCC BAA-	AF297868
<i>H. bilis</i>	Fare, köpek, ve insan	ATCC 51630T	U18766
<i>H. canadensis</i>	İnsan	ATCC 700968T	F262037
<i>H. canis</i>	Köpek, insan	ATCC 51401T	L13464
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	ATCC 700242T	U46129
<i>H. cinaedi</i>	İnsan, hamster ve rhesus	CCUG 18818T	M88150
<i>H. fennelliae</i>	İnsan	ATCC 35684T	M88154
<i>H. ganmani</i>	Fare	CCUG 43526T	AF000221
<i>H. hepaticus</i>	Fare	ATCC 51448T	U07574
<i>H. mesocricetorum</i>	Hamster	ATCC 700932T	AF072471
<i>H. muridarum</i>	Fare, Sıçan	ATCC 49282T	M80205
<i>H. pametensis</i>	Kuş, domuz	ATCC 51478T	M88147
<i>H. pullorum</i>	Tavuk, insan	ATCC 51801T	L36141
<i>H. rodentium</i>	Fare	ATCC 700285T	U96296
<i>H. trogontum</i>	Sıçan	ATCC 700114T	U65103
<i>H. typhlonius</i>	Fare	MU96-1T	AF061104

ATCC: American Type Culture Collection; T, type strain; CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Dept. of Clinical Bacteriology, Göteborg, Sweden.

2.2.1. Doğal ortamları

Helicobacter'ler insanların mide veya barsak mukozalarının yanı sıra, köpekler, kediler, koyunlar, sığırlar ile birçok küçük kemirici ve kuşlarda gastrointestinal sisteminde yerleşebilirler. İnsanlarda mide ve gastrik hücre metaplazisi görülen alanlar dışındaki bölgelerden kolonizasyonu oldukça nadirdir. Bununla birlikte *H.pylori*'nin tükürük, diş plağı ve aterom plaklarında görüldüğü bildirilmiş, safra taşlarının oluşumu ile ilişkili oldukları da moleküler düzeydeki çalışmalarla ispatlanmıştır.^{27,28} Diğer taraftan *H.pullorum* ve *H.cholecystus*'unda karaciğer ve safra yollarına yerleşebildiği ileri sürülmüştür.²⁹ İn vitro şartlara karşı aşırı duyarlı olan Helikobakterlerin toprak, akarsu ve deniz suyu gibi çevresel örneklerden, deneysel çalışmalar dışında izolasyonu yapılamamıştır. Ancak PCR gibi NAAB yöntemlerle doğal çevresel örneklerde Helikobakter hedef gen dizilerinin varlığı gösterilmiştir. Ancak bu sonuçlar Helikobakterlerin doğal ortamlarda gerçekten canlı kalıp kalmadıklarının veya ne kadar süre ile canlı kaldıkları bilinmemektedir.

H.pylori ve diğer gastrik türler için en önemli doğal ortam mide mukoza yüzeyidir. Bakteri gastrik mukozayı örten mukus tabakasının asit gradientinden etkilenmez, ancak mukozal yüzeydeki nötr mukusa kadar ilerleyerek, özellikle alkali

mukus sekrete eden antrum bölgesinde yerleşir. Fakat artmış asit sekresyonuna bağlı olarak gastrik hücre metaplazisi görülen alanlarada da kolonize olabilir. Klinik patoloji şekillenmiş hastalardan alınan doku örneklerinin elektronmikroskobu ile incelenmesinde, *H.pylori*'nin insan gastrik mukoza hücrelerine adhere olduğunu ve histopatolojik değişimlerin şiddeti ile paralel olmak üzere bazı olgularda hücrelerin taban kısmına tutunduğunu göstermiştir. Bu bölgelerde bulunan mikrovilluslarda, hücre iskelet yapısının bozulduğu, hücrelerin yassılaştığı ve kuş görünümü aldığı, mün granüllerinin kaybolduğu ve hücreler arası desmosom ve *tight junction*'ların kaybolduğu gözlenmiştir.³⁰

Bazı enterohepatik türlerin, özellikle *H.cinaei*'nin, birçok memeli türü ile birlikte insanların, rodentlerin ve kuşların bağırsaklarında, kolonik kriplere ve mukus katman bitişğine yerleşebildiği bildirilmiştir. Yine bazı enterik türler asit sekresyonu defektli hastalarda mideye yerleşebilir. Örneğin *H.cinaedi*'nin kronik gastrit ve peptik ülser hastalığında rolü tartışmalı olmakla birlikte, midede bulunduğu dair bazı moleküler deliller vardır.^{4,31,32}

2.3. Morfolojik, Fizyolojik Özellikleri ve Antijenik yapı

H.pylori "S" virgül, martı veya kısa spiraller şeklinde görülen, hareketli, kapsülsüz ve sporsuz mikroaerofilik bakterilerdir. Hücre duvarına somatik antijenik özellik veren LPS'deki karbon yan zincirleri sayı ve yapısı ile diğer Gram negatif bakterilerden farklı olmakla beraber helikobakterler Gram negatif basillerdir.

2.3.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

H.pylori, 2,5-5,0 µm boyunda, 0,5-1,0 µm eninde, künt ve yuvarlak uçlu, sporsuz, spiral veya helikal şekilli mikroorganizmadır. Mukus ve epitelyum yüzeyinden hazırlanan preparatlarda balık sürüleri halinde nispeten daha uzun ve kıvrımlı görünüm dominantken, besiyerinde üretilmiş kolonilerden hazırlanan preparatlarda spiral formlar daha nadir olup, sıklıkla kısa kıvrımlı tekli basiller şeklinde görülürler. Dışkıdan hazırlanan yayma preparatlarla, antibiyotik kullanımı sonrası veya oksidatif strese maruz kalmış gastrik doku örneklerinden hazırlanan preparatlarda ise düzensiz çubuklar veya yuvarlak, kokoid şekillerde görülürler. "*Dormand form*" olarak tanımlanan kokoid

bakterilerin in-vivo şartlarda tekrar spiral şekle dönüp çoğalıp çoğalmadıkları tartışılmaktadır.³³ Ancak son yıllarda bu formların reaktivasyonlardan sorumlu olabileceğine dair güçlü kanaat oluşmuştur. *H.pylori*'nin gastrik mukozada birçok farklı formda görülebilmesi, bakterinin mikroçevrenin şartlarına bağlı olarak dinamik ve değişen durumlara adapte olabilen bir biyolojiye sahip olduğu göstermektedir. Nitekim enteropatik türler *H.pylori*'ye oranla daha basit ve stabil morfolojik özelliğe sahiptirler.

Orijinal formdaki bütün *Helicobacter* türleri sahip oldukları en az 1-6 adet unipolar flajellaları sayesinde oldukça hareketlidir.³⁴ *H.bizzeroni* ve *H.salmonis* gibi kültürü yapılabilen türler ve *H.heilmannii* türünde flagella sayısı 23'e kadar ulaşabilir. Gastrik türler içerisinde, flagelladan bağımsız periplazmik fiberlere sahip tek tür *H.feli*'tir. Kampilobakter türlerinin aksine Helikobakterlerin çoğunda, özellikle *H.pylori*'de, flagella kılıflıdır ve uç kısımlarında topaç benzeri şişkinlik ve disklere sahiptir. Bu yapı, bakterinin gastrik mukus gibi viskoz ortamlarda tirbişon tarzı hareketi için gereklidir. Elektron mikroskopisi ile flagellar kılıfın hücre duvarının dış membranı ile devam ettiği gösterilmiştir. Ancak bu bir aksiyal flamant değildir. *H.pullorum* ve *H.rodentium* gibi bazı türler kılıfsız flagellalara sahiptir.

H.pylori'nin özgün morfolojisi, ışık mikroskobu ile başarılı bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Hematoksilen-Eozin, Modifiye Giemsa, Warthin-Starry gümüş boyası, Akridin oranj (floresan boya), Cresil-fast Moru, Gimenez ve Brown-Hopps moru gibi çeşitli histolojik boyalarla başarılı bir şekilde boyanabilmektedir.

2.3.2. Hücre zarı, Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

Helikobakterler; hücreye somatik antijenik özellik veren lipopolisakkarit (LPS) ve ince bir peptidoglikan tabakadan oluşan yarı geçirgen dış duvar ve fosfolipidlerden zengin stoplazmik membran varlığı ile tipik gram negatif hücre duvarı yapısına sahiptir.

H.pylori'nin hücre duvarında yer alan protein ve yağ asitlerinin kompozisyonu diğer gram negatif bakterilerden özellikle de kampilobakterlerden farklıdır ve ayırıcı niteliktedir. *H.pylori*'nin lipid içeriğini ağırlıklı olarak % 73,4 oranında fosfolipitler, % 20,6' oranında glikolipitler ve % 6 oranında da nötral lipidler oluşturmaktadır. Major fosfolipidler fosfatidiletanolamin, kardiyolipin ve fosfatidilgliserol'dür. En çok

rastlanan hücresel yağ asidi % 31-45 oranıyla miristik asit ve % 20-24 oranıyla 19-karbon siklopropan yağ asididir.

Hücre duvarında LPS'nin Lipit A'nın içeriğinde; yüksek oranda tertradekanoik asit (14:0) ve 19 karbonsiklopropan (19:0 cyc) gibi uzun zincirli yağ asitleri yer alır. Yapıda daha düşük oranlarda da hekzadekanoik (16:0), oktadekanoik (18:0) ve linoleik (18:2) asitler yer alır.³⁵ Hücre duvarı yapısında fosfatidil etanolamin (% 79.1), lizofosfatidiletanolamin (% 16) ve fosfatidil kolin (% 1.9) gibi polar başlı nötral fosfolipitlerin yanı sıra fosfatidik asit (% 52.7) ve fosfatidiserin (% 47.3) gibi asidik fosfolipitlerden bulunmaktadır. *Kampilobakter*lerin hücre duvarında görülen metilli menakuinonlar *H.pylori* de yoktur. *H.pylori*'nin peptidoglikan tabakası yüksek oranda muropeptit içerir ve glisinle sonlanan pentapeptid zincire ve anhidro-N-asetilmuramik asit içeriğine sahip olmasıyla diğer gram negatif bakterilerden oldukça farklıdır. *H.pylori* türlerinde stoplazmik membranda bulunan kolesterol glukozit *H.pylori* türü için spesifiktir.³⁶

Ultrastrüktürel çalışmalar hücre duvarı ile stoplazmik membran arasında gram negatif bakterilerde olduğu gibi yaklaşık olarak 30 nm genişliğinde bir periplazmik boşluk olduğu gösterilmiştir.³⁷ Elektron yoğun sitoplazmada genomik materyal ve ribozomları bulunmaktadır.³⁴

2.3.2.1. Lipopolisakkaritler

Helikobakterlerin "S" tipi suşlarında, diğer gram negatif bakterilerde görülen Lipit A, merkez oligosakkarit ve dallanmış polisakkaritlerden oluşan ve hücreye somatik O antijenik özelliği kazandıran LPS yapısında bulunur. *H.pylori* suşlarında karbon zincir sayısı diğer gram negatif bakterilere göre azalmış (5'e düşmüş) zincirlerdeki karbon atom sayısı ise artmıştır. Bu hali ile somatik antijen aynı yapıya sahip *E.coli* ve *Salmonella* somatik antijenlerine göre yaklaşık olarak 1000 kat daha düşük immunojenidir. Bu özellik bakterinin gastrik mukozada uzun süreli kolonizasyonuna ve gastrik mikroçevreye uyum için gerekli organizasyonları yerine getirmesine fırsat verir.⁴

H.pylori'nin lipopolisakkaritlerinin dikkat çekici bir başka özelliği de Lewis^x veya Lewis^y doku antijenleri ve Tip 1 kan grup antijenleri Le^a, H-1 (Le^d) ile homolog

özellik gösteren fukozillenmiş ve fukozillenmemiş *N*-asetillaktozamin rezidülerine sahip olmalarıdır. Aslında bu homoloji konak hücre immün cevabından kaçış ve gastrik mukozada uzun süreli kalışın önemli bir diğer sebebidir. Muhtemelen bakteri hayatın ilk dönemlerinde kolonize olduğu konağın Lewis antijenlerini taklit ederek, persistensi sağlamaktadır.³⁸ Lewis^x - Lewis^y dönüşümünde tekrarlayan dizilerdeki muhtemel kaymaların etkili olduğu düşünülmektedir.³⁹

2.3.2.2. Lipit A

H.pylori'nin lipopolisakaritlerindeki Lipid A'nın yapısal özelliğide diğer gram negatif bakterilerden önemli farklılıklar gösterir. Özellikle kronik kolonizasyonlarda Lipid A'nın yapısında sürekli mutasyonlar görüldüğü bildirilmiştir. Birçok bakteriden farklı olarak *H.pylori* suşlarında Lipid A'nın yapısında 3-hidroksidekanoik asit yer almaz, buna karşılık alışılmışın dışında biyolojik yönden daha düşük aktiviteye sahip fosforillenmiş veya açillenmiş yağ asitleri görülür ki bunlar genel anlamda LPS'nin düşük biyolojik aktivitesinde sorumludur.⁴⁰ *H.pylori*'nin Lipid A komponenti enterobakterilerle kıyaslandığında çok düşük oranda mitojenik, pirojenik ve letal toksite gösterir. Diğer taraftan *H.pylori* lipopolisakaritleri *E.coli* lipopolisakaritlerine göre lipit bağlayıcı proteinlere ve CD14'lere daha daha zayıf bağlanır.

2.3.2.3. *H.pylori*'nin dış duvar proteinleri

H.pylori hücre duvarında, gastrik mukozaya bağlanma ve gastrik mikroçevreye uyumu sağlayan proteinlerle mukozal immün cevabı provoke ederek gastroduodenal patolojide önemli olan, çok sayıda protein yapıda elemanlar yer alır. Bu yapılar arasında tipe IV sekresyon sistemi komponentleri, porinler, adhezinler, hemagglütininler ve flagellar proteinler önemlidir.

2.3.2.3.1. Porinler

Porinler *H.pylori*'nin dış zarına yerleşmiş ve özellikleri en iyi tanımlanmış proteinlerdir. *H.pylori* suşlarında şimdiye kadar 5 porin proteini belirlenmiş ve

fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir. Bu porinler HopA-HopE olarak isimlendirilmiştir. Moleküler ağırlıkları 29 ve 75 kDa arasında olan porin proteinleri içleri su dolu non-spesifik kanallardır. Anyon ve katyonlar için düşük düzeyde seçicilik gösterirler. Bu kanallar hidrofilik moleküllerin, besinlerin ve bazı antibiyotiklerin dış zardan pasif geçişine izin verirler.⁴¹ Bu kanalların kaybı *Pseudomonas* suşlarındaki porinlerin kaybına benzer ve hidrofilik antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ne sebep olur.

2.3.2.3.2. Adhezinler

Midedeki *H.pylori*'lerin yaklaşık % 20 kadarı epitel hücre yüzeyindeki glikolize yapılara yapışık halde bulunur.⁴² Gastrik biyopsi örneklerinin elektron mikroskopik incelemelerinde, *H.pylori* suşlarının gastrik hücreler arasındaki birleşme alanlarında tropizm gösterdikleri dikkat çekmiştir. Desmosomlar ve tight junction'ların inflamatuvar hücreler tarafından sekrete edilen proinflamatuvar sitokinlerle koptuğu alanlarda bakterinin hücreler arası boşluktan lamina propriaya doğru göç ettiği hatta translokasyon gösterdiği görülür.^{43,44}

Bütün bu gözlemler gastrik mukoza adezyonda, Lewis antijenleri, laminin, fibronektin, kollejen, glukokonjugatlar ve fosfolipitler gibi özelleşmiş moleküllerin hedef yapı elemanları olduğunu göstermiştir. *H.pylori* suşlarında genomik analizler ile, bakterinin nispeten küçük genoma sahip olmasına rağmen, mukozal yüzey ile adezyonu ve mikroçevreye uyumu sağlayacak, dış membranda yer alan proteinleri kodlayan 30'dan fazla gene sahip oldukları gösterilmiştir. Bu proteinlerden adezyonda rol aldığı bilinen ve üzerinde en çok çalışılanlar, epitel yüzeyindeki glikoprotein yapıdaki Lewis antijenlerinin fukozillenmiş epitoplarına bağlanan (Hop B) dış membran proteinleridir.⁴⁵ Ayrıca Hop protein ailesinin bir üyesi olan BabA (HopS)'nin Lewis B'ye bağlanmada bir adhezin gibi aracılık ettiği gösterilmiştir ve bunun önemli bir virülans faktörü olabileceği ileri sürülmüştür.⁴⁶

H.pylori'nin 25-kDa'lık bir dış zar proteininin lektin benzeri bir yolla laminine yapışmakta aracılık ettiği belirlenmiştir. Bol glikozilli bu proteinin membranın alt kısımlarına yerleştiği gösterilmiştir.⁴⁷ HopZ ve HopH (OipA)'nın mutagenesis çalışmalarına dayanarak adhezinler gibi rol oynadıkları düşünülmektedir. Yapılan

çalışmalarda bu iki proteinin kültürde gastrik adenokarsinoma hücrelerine baēlanmada kısmen aracılık ettikleri gösterilmiştir fakat henüz reseptörleri tanımlanmamıştır.^{48,49} AlpA ve AlpB proteinlerinin de adheziv oldukları in vitro şartlarda gösterilmiş ve bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların kobay midelerinde kolonizasyon defektine yol atıēı gösterilmiştir.⁵⁰

2.3.2.3.3. Hemaglutininler

Bakteri sahip olduēu hemaglutininleri sayesinde eritrositleri aglutine edebilmektedir. *H.pylori*'nin ilk tanımlanan hemaglutininini HpaA proteinidir.⁵¹ Sitoplazmik membrana ve dış zara yerleşmiş bir başka major lipoprotein Lpp20'dir.⁵² Lpp20 farelerde pasif immunizasyon amaçlı kullanıldıēında koruyucu olduēunu gösteren sonuçlar vardır.⁵³ DnaK ve katalaz benzeri sitoplazmik proteinlerin hücre yüzeyine yerleřebileceēi ve glikolipit ve glikoproteinleri baēlamada aracılık edebileceēi düşünülmektedir.^{54,55}

2.3.2.4. Flajella

H.pylori'nin ultrastrüktürel yapısı en az bir adet bulunan unipolar kılıflı flajella ile karakterizedir ve sayıları 8'e kadar çıkabilmektedir. Flajellar filament sıklıkla topaç benzeri bir şişkinlikle sonlanır ve bunu devam eden dış membran çevrelemektedir. Türler içinde korunmuş olan bu flajellar kılıfın epitoplara immün sistemden maskelenmesinde ve asidik direnci saēlamakta rol oynadıkları düşünülmektedir.⁵⁶ Bu epitoplar *Campylobacter jejuni* flagellin proteinlerine karşı oluşmuş antikörlerle çapraz reaksiyon vermektedirler. Flament, flagellin subünit FlaA ve FlaB'nin polimeridir.⁵⁷ FlaA baskın subtip, FlaB ise minör subtiptir ve flagellumun taban kısmına yakın yerleşimlidir.⁵⁸ Hem *flaA*'nın hem *flaB*'nin izogenik mutantları ile yapılan çalışmalarla tam bir motilite için ikisininde gerekli olduēu gösterilmiştir.⁵⁹ *flgE* geni engelin yapısal proteinin kodlamaktadır ve *flgD* geni engel ilişkili proteini (HAP2) kodlamaktadır ve bu protein flajellar proteinin ucuna yerleşmiştir. Bu gen flagellin monomerlerinin organizasyonunu düzenlemektedir. Mutant *flgE*'ye sahip bakterilerin hareketsiz ve flajellasız oldukları gösterilmiştir.⁶⁰

Geçen 20 yıl içerisinde periplazmik fiberler, flajellaların sayıları ve yerleşim yerleri gibi morfolojik özellikler diğer fenotipik özelliklerle ile kombine edilerek türlerin ayırımlarının yapılmasında ve yeni türlerin tanımlanma standartlarının geliştirilmesinde kullanılmışlardır.

2.4. Genomik Özellikler

Bakterinin sahip olduğu genomik yapı ve çeşitlilik PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), Ribotiplleme, random amplifiye polimorfik DNA (RAPD-PCR) ve PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi teknikler kullanılarak incelenmiş ve suşlar arasında nükleotitlerin oldukça fazla çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir.⁶² İlk olarak 1997 yılında Tomb ve arkadaşları tarafından *H.pylori*'nin 26695 nolu suşunun tam genom dizi analizinin bildirilmesiyle genomik yapı hakkındaki bilgilerde hızlı bir artış gerçekleşmiştir. Bunu takiben sırayla *Helicobacter pylori* J99, *Helicobacter hepaticus* ATCC 51449, *Helicobacter pylori* HPAG1, *Helicobacter acinonychis* str. Sheeba, *Helicobacter pylori* Shi470 ve son olarak da *Helicobacter pylori* 98-10, B128, B38, HPKX_438_AG0C1, HPKX_438_CA4C1 suşlarının tam genom dizi analizi tamamlanmıştır. Bu güne kadar *H. pylori* ile ilişkili 10'dan fazla plazmidin tam dizi analizi tamamlanmıştır.⁶¹

H. pylori'nin 26695 suşu toplam 1.667.867 baz çiftine ve % 39 G+C oranına sahip tek bir sirküler yapıda kromozoma sahiptir. Toplam gen sayısı 1590 olup her biri ortalama 1049 baz çifti taşımaktadır. Bu kodlanan genler arasında 16S, 23S ve 5S ribosomal RNA (rRNA) genleri, DNA replikasyonunda görev alan *gyrA*, homolog DNA rekombinasyonundan sorumlu *recA* ve *ftsH* genleri gibi hücre canlılığı için önemli olanlar belirlenmiştir. Genomda en az 2 kopya halinde 16 ve 23S rRNA geni bulunmaktadır. 1999 yılında, ABD'de duodenal ülseri ve duodeniti olan bir hastadan izole edilen ikinci bir *H.pylori* suşunun tüm genom dizi analizi yayınlandı. İki suşun sekansları, karşılaştırmalı analizlerle yoğun bir şekilde çalışılmış ve genomun fiziksel düzeni, otolog genlerdeki allellik çeşitlilik ve hipervariable bölgelerdeki suş spesifik farklılıklar aydınlatmaya çalışılmıştır. Tablo 4'de dizi analizi tamamlanan bazı Helikobakter türlerinin kıyaslanması görülmektedir. Sekansı yapılan genomların karşılaştırmalı analizleri ile kodlanan bölgelerin % 7'si suş spesifik olarak

tanımlanmıştır ve bunların % 70'den fazlasının fonksiyonu belirlenememiştir. Suş spesifik genlerin yaklaşık yarısı esnek bir bölge içermektedir ve bu bölgelede G/C oranı % 35 oranıyla daha düşüktür zira bu oran diğer bölgelerde % 39'dur.

Genlerin 300'den fazlası membran yapısı ile ilişkilidir. Ayrıca beta-galaktozidaz 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 enzimini kodlayan fonksiyonel gen bölgeleri tanımlanmıştır. Bakteride virulansla ilişkili olduğu düşünülen birçok gen bölgesi tespit edilmiştir. Bunlar arasında dış membran proteinleri (*oipA*) ve lipopolisakkarit moleküllerini kodlayan genler, vakuolizasyon sitotoksin geni (*vacA*), sitotoksin ilişkili gen (*cagA*), adhesin geni (*hpaA*), flagellin genleri (*flaA* ve *flaB*), üreaz gen kümesi yapısal alt birimleri kodlayan *ureA* ve *ureB* geni ile üreaz aktivitesi için gerekli olan *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* ve *ureI* genleri sayılabilir. *H.pylori* 26695 suşunda 5 bölgede "Patojenite adaları"na (PAI – Pathogenicity Islands) benzer şekilde düşük G+C oranına (% 33-35) sahip farklı gen dizileri belirlenmiştir. Genomda çok sayıdaki genin farklı yer ve sayıda tekrarladığı belirlenmiştir. Bu durum *H.pylori* geninde yeniden düzenlenme olaylarının ve hatalı eşleşmelerin sıklığını göstermektedir. *H.pylori* suşlarının en az % 40'ında büyüklükleri 1,5 kb ile 23,3 kb arasında değişen bir veya birden çok plazmid bulunmakla birlikte bunların virulansla ilişkili bir gene sahip oldukları gösterilememiştir. *H.pylori*'de plazmit transferi şimdiye kadar belirlenememiştir.⁴

H.hepaticus'un tam genom sekansının yayınlanması, *H.pylori* genomuna farklı yeni bakış açıları getirmiştir (Tablo 4). Bu türün genomu 1,799 Mb büyüklüğü ile ve % 35,9 G/C içeriği ile *H.pylori* ve *C.jejuni* genomundan daha büyüktür. *H.hepaticus*, VacA toksin ve çoğu *cagAPI* proteinlerine sahip değildir. Genom 71 Kb'lık bir genomik adaya sahiptir ve birçok genomik ada'nın G/C içeriği kalan gen bölgelerinden farklıdır. *H.hepaticus* izolatlarının mikarray hibridizasyon testleri ile kıyaslanmasıyla türler arasındaki aşırı farklılığın olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4: Genom sekansı tamamlanan bazı *Helicobacter* türlerinin kıyaslanması

	<i>H.pylori</i> 26695	J99	<i>H.hepaticus</i> ATCC 51449
Büyüklik (baz çifti)	1,667,867	1,643,631	1,799,146
% G/C	39	39	35.9
Gen kopyaları			
23S-5S rRNA	2	2	1
16S rRNA	2	2	1
Tahmini kodlanan sekans	1590	1496	1825
Fonksiyonu belirlenmiş protein	899	877	1022
Fonksiyonu belirlenmemiş protein	325	347	487

2.5. Kültür ve Üreme özellikleri

H.pylori adi besiyerlerinde üretilmeyen, optimize edilmiş besiyerlerinde bile son derece yavaş üreyen müşkülpesent bir mikroorganizmadır. Üremenin sağlanması için % 7-10 oranında eskitilmiş at kanı, % 1 izovitaleks, % 0,25 maya ekstraktı içeren Brusella agar, Çikolata agar, Beyin Kalp İnfüzyon agar Colombia ve Skirrow agar gibi modifiye zenginleştirilmiş besiyerleri kullanılmaktadır. Ayrıca besiyerlerine hemin, serum, nişasta, kömür ilavesi üremeyi artırabilir. Ancak *C.jejuni* üremesini artırmak amacı ile besiyerlerine ilave edilen ferrözsülfat-sodyummetabisülfid-sodyum pürivat'daki bisülfid'in, safra tuzlarının ve koyun kanının *H.pylori*'nin üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir.⁶³ *H.pylori* midenin asit ortamında mukozaya kolonize olarak üremesine rağmen asidofilik bir bakteri değildir. Optimal üreme pH'ları 6,9-7,6 olup, bakteri oldukça geniş pH (5-8) aralığında üreyebilir. Mide'nin özellikle parietal hücrelerin yer aldığı oksintik kanalların içerisinde 1-1,5'e kadar düşen asidik ortamında, üreyebilmesi bakterinin güçlü üreaz aktivitesi ve hücre membranında kısa sürede gerçekleştirdiği adaptif değişikliklere bağlıdır.^{64,65} *In-vitro* şartlarda modifiye besiyerlerinde optimal üremenin sağlanabilmesi için besiyerinin pH'sı 7,2 olmalıdır.⁶⁶ Güçlü oksidaz superoksit dismutaz, peroksidaz, sitokrom oksidaz ve katalaz aktivitesi göstermelerine rağmen hiçbir helicobakter türü aerobik atmosferde üreyemez. Zorunlu anaerop olan *H.gammani* dışında bütün helicobakter türleri % 5-10 oranında CO₂ içeren mikroaerobik atmosferde ürerler. *In-vitro* üremenin optimizasyonu için ortamda bulunması gereken oksijen konsantrasyonu % 2-8 dir. Optimal üreme ısıları 37°C (30-37 °C) dir. Hastadan alınan biyopsi materyalinde üretim yapılacaksa, örneğin lezyonun kenarından ve mümkünse birden fazla alandan alınması gereklidir. Biyopsi materyali mümkünse hasta başında ekilmelidir. Bunun mümkün olmadığı hallerde biyopsi

materyali içerisinde % 3 oranında gliserin, vankomisin, trimetoprim, kolistin, polimiksin B, nalidiksik sikloheksimid, nistatin veya amfoterisin B eklenmiş brucella buyyon, nutrient buyyon veya beyin-kalp infüzyon buyyon gibi sıvı besiyerleri içerisinde, soğukta taşınmalı ve en geç 2 saat içerisinde kültür için değerlendirilmelidir.

Uygun besiyerlerine ekilen örnekler, uygun atmosfer ve ısı şartlarında inkübe edilerek, üremenin tespiti için 3. 5. ve 7. günlerde kontrol edilir. En iyi sonuç 7 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilir. İnkübasyon periyodu sonunda kanlı besiyerlerinde düzgün, pigmentsiz, 0,5–2 mm çapında saydam su damlasına benzer koloniler oluşturdukları görülür. Bir haftadan daha uzun süre inkübe edilen besiyerlerinde kolonilerin çapı 2 mm'yi geçebilir. At kanlı (%5) agarda zayıf hemoliz oluştururlar. Şüpheli koloniler; gram yayma preparasyonlarında ki mikroskopik morfolojik özellikleri, oksidaz, katalaz ve üreaz aktiviteleri dikkate alınarak ön tanı alırlar.⁶⁷

H.pylori in vitro şartlardaki 3-4 pasajdan sonra canlılığını kaybeder.⁶⁵ *H.pylori* izolatları % 0,25 maya ekstraktı, % 10 at kanı ve % 15 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon buyyonda (BHIB - Brain Heart Infusion Broth) –70°C de aylarca korunabilir veya liyofilize halde +4°C'de saklanabilirler.

2.6. Biyokimyasal Özellikleri

Helikobakter türlerinin biyokimyasal aktiviteleri düşüktür. *H.canis* ve *H.winghamensis* dışındaki türler güçlü oksidaz ve katalaz aktivitesi gösterirken, bütün türler DNAaz, lösinaminopeptidaz ve gama-glutamilaminopeptidaz aktivitesine sahiptir. Ancak oksidaz, katalaz ve üreaz gibi birkaç enzimatik aktivite dışında, diğer bakterilerin tanısında kullanılan klasik biyokimyasal ve enzimatik testlerin çoğu Helikobakterlerde aktivite olmasına rağmen *in-vitro* şartlarda tanı amaçlı olarak kullanılamaz. Diğer taraftan nitratları nitrite indirgemeleri, alkalin fosfataz, üreaz, indoksil asetat hidrolasilaz, gama-glutamil transpeptidaz aktiviteleri, 42°C'de üreme, nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılık özellikleri tür tanımında kullanılmaktadır (Tablo 5).

H.pylori oldukça güçlü bir şekilde üreaz, katalaz ve alkalin fosfataz aktivitesine sahiptir, nitratları redükte edemez, sülfürlü bileşikler kullanarak H₂S oluşturabilir, hippuratu hidrolize edemez, nalidiksik aside dirençli ve sefalotine duyarlıdır.

2.7. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Duyarlılık

H.pylori in-vitro şartlara son derece duyarlı bir organizmadır. Kuruluk, güneş ışığı, düşük nem oranı gibi çevresel şartlarda kısa sürede inaktive olurlar. Mikroorganizmanın canlılığını çevresel su örneklerinde, kültürde üretilmeyen kokoid formda sürdürdüğü belirlenmiştir.⁶⁸ Bununla birlikte oldukça düşük konsantrasyonlardaki hipoklorik asit, glutraldehit, perasetik asit gibi dezenfektanlara duyarlıdır.

Tablo 5: *Helicobacter* türlerinin karakteristik özellikleri.

Taksonomi	Katalaz Üretimi	Nitrat redüksiyonu	Alkaline fosfotaz hidrolizi	Üreaz	Indoxyl asetat hidrolizi	g-Glutamil transferaz	42°C'de % 1 Glisin üreme	Nalidiksik asit (30 mg disk)	Sefalotin (30-mg disc)	Periplasmik fiber	Flajella sayısı	Flajella yerleşimi	G+C oranı
Gastrik:													
<i>H. acinonychis</i>	+	-	+	+	-	+	-	R	S	-	2-5	Bipolar	30
<i>H. bizzozeronii</i>	+	+	+	+	+	+	-	R	S	-	10-20	Bipolar	ND
<i>H. felis</i>	+	+	+	+	-	+	-	R	S	+	14-20	Bipolar	42
<i>H. mustelae</i>	+	+	+	+	+	+	-	S	R	-	4-8	Peritrik	36-41
<i>H. nemestrinae</i>	+	-	+	+	-	ND	+	R	S	-	4-8	Bipolar	24
<i>H. pylori</i>	+	-	+	+	-	+	-	R	S	-	4-8	Bipolar	37-39
<i>H. salomonis</i>	+	+	+	+	+	+	-	R	S	-	10-2	Bipolar	ND
Enterohepatik:													
<i>H. aurati</i>	+	-	-	+	+	+	+	S	R	+	7-10	Bipola	ND
<i>H. bilis</i>	+	+	ND	+	-	ND	V	R	R	+	3-14	Bipolar	ND
<i>H. canadensis</i>	+	V	-	-	-	-	+	R	R	-	1-2	Bipolar	ND
<i>H. canis</i>	-	-	+	-	+	ND	-	S	I	-	2	Bipolar	48
<i>H. cholecystu</i>	+	+	+	-	-	-	+		R	-	1	Mono	ND
<i>H. cinaedi</i>	+	+	v	-	-	-	V	V	V	-	1-2	Bipolar	37-38
<i>H. fennellia</i>	+	-	v	-	+	-	V	S	S	-	2	Bipolar	37-38
<i>H. ganman</i>	V	+	-	-	-	ND	-	S	R	-	2	Bipolar	ND
<i>H. hepaticu</i>	+	+	ND	+	+	ND	-	R	R	-	2	Bipolar	ND
<i>H. mesocricetorum</i>	+	+	+	-	ND	-	+	S	R	-	2	Bipolar	ND
<i>H. muridarum</i>	+	-	+	+	+	+	-	R	R	+	10-14	Bipolar	34
<i>H. pametensis</i>	+	+	+	-	-	-	+	S	S	-	2	Bipolar	38
<i>H. pullorum</i>	+	+	-	-	-	ND	+	S	R	-	1	Mono	34-35
<i>H. rodentium</i>	+	+		-	-	-	+	R	R	-	2	Bipolar	ND
<i>H. trogontum</i>	+	+	-	+	ND	+	+	R	R	+	5-7	Bipolar	ND
<i>H. typhlonius</i>	+	+	-	-	-	-	-	ND	ND	-	2	Bipolar	ND

+: pozitif reaksiyon; -: negatif reaksiyon; S: duyarlı; R: dirençli; I: intermediate; ND: belirlenmemiş; V: değişken; Mono: Monopolar.

2.8. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonları

H.pylori insanlarda midenin antrum ve korpus bölgelerinde sıklıkla asemptomatik olarak kolonize olabilen nadir mikroorganizmalardandır. Ancak asemptomatik kişilerin % 10-20'sinde kolonizasyon takibeden 10 yıl içerisinde en az bir defa akut atak geçirme ihtimalinin olması, asemptomatik taşıyıcılık yerine, subklinik enfeksiyondan tanımını kullanmanın daha doğru olabileceğini düşündürmektedir. *H.pylori* enfeksiyonları, konağın özellikleri, beslenme alışkanlıkları, genetik özellikleri, gastrik mukozadaki defansın yetmezliği, enfekte eden suşun sayısı ve varsayılan virülans faktörleri, yerleşim alanı, reenfeksiyon veya reaktivasyon sayısı ile tedavi başarısızlıkları gibi değişkenlere bağlı olarak, subklinik bir enfeksiyondan gastrik kanserlere kadar değişen geniş bir gastrduodenal patlojiye sebep olurlar.

2.8.1. Enfeksiyonun Bulaşması

H.pylori'nin dünya genelinde çok sayıda insanda kolonize olması bakterinin oldukça güçlü bir yayılma stratejisi geliştirdiği izlenimini uyandırmaktadır. İnsanlarda bulaş; fekal-oral yolla, ağız içi sekreyonların bulaşı ile yani oral-oral yolla, ev hayvanlarından, insan-hayvan-insan yolu ile, kontamie gıda ve su yolu ile gerçekleşir. Epidemiyolojik çalışmalar, enfeksiyonların sıklıkla aile içinde, kişiden kişiye yakın temas şeklinde olduğunu gösterilmiştir. *H.pylori*'nin aile içi gibi kapalı toplumlardaki süregenliği ve bakteri ile insanlar arasında ki yakın ilişki, *H.pylori* suşlarının genotipleri ve allelik farklılıkları ile konağı arasında evrimsel bir birlikteliği ortaya komuş, böylece ilk olarak bir bakteri genotipi ile insanların evrimsel süreçteki yerleri hakkında fikir ele edilmiştir. Mesela Pre-Colombian döneme ait Amerikan yerlilerinden izole edilen *H.pylori* suşlarının allelik özellikleri, Colombian dönem yerleşkeçilerinden izole edilenlerden farklı, ancak Asya kökenli suşlarla aynı bulunmuştur. Bu da Amerikan yerlilerinin Asya kaynaklı olduğu hipotezini desteklemiştir.^{69,70}

Ailedeki fert sayısı ve kötü hijyen *H.pylori* bulaş riskini artırır. *H.pylori* enfeksiyonu genellikle çocukluk çağında, anneden çocuğa veya kardeşten kardeşe geçiş şeklinde olmakta, bulaştan sonraki kolonizasyon da ömür boyu devam etmektedir. Longitudinal çalışmalar, enfeksiyonu kazanma riskinin annenin⁷¹ ve kardeşlerin⁷² enfeksiyon durumu ile yüksek oranda ilişkili olduğunu göstermiştir⁷³. Bazı yayınlarda

kolonizasyonun hayatın ilk aylarında başladığı, bazı yayınlarda da 10 yaşındaki çocukların yaklaşık olarak % 90'ında kolonizasyon tespit edildiği bildirilmiştir.⁷⁴ Bu dönemde midede birden fazla suşun kolonize olabileceği, suşların çoğunun yarışçı inhibisyon yolu ile eradike olurken, konağın mide mikroçevresine ve immün sistemine uyum gösterebilen bir suşun kalıcı kolonizasyon oluşturduğu ileri sürülmüştür.⁷⁵ Çocuklarda kesin olarak bilinmemekle birlikte yetişkinlerde gastrik kolonizasyon için gerekli olan bakteri sayınsın, suşa bağlı olarak, 10^5 ile 10^9 arasında değişebildiği tespit edilmiştir.⁷⁹

H.pylori insanlarda, gaitadan, diş plaklarından ve tükürükten izole edilmiştir.⁷⁷ Ağız içerisinde diş plaklarında kolonize sular plaktan sekresyonlara oradan da otoinokülasyonla gastrik mukozaya göç edebilmektedir. Diğer taraftan da gastrik kolonizasyon, gastroözefagal reflü ile bakterinin tekrar ağıza ulaşmasına yol açmaktadır. Böylece aile içerisindeki oral-oral bulaş devam etmektedir. Çinli ve Batı Afrikalı çocuklarda gözlenen artmış enfeksiyon oranı bu annelerin çocuklarıyla ortak kaptan yemek yemelerine yani ora-oral bulaş bağlanmıştır. Yine eldivensiz çalışan endoskopistlerde yüksek enfeksiyon oranı tespiti sekresyonların potansiye bulaş yolu olduğunu doğrulamaktadır.⁷⁸ Diğer taraftan gelişmekte olan ülkelerde Hepatit-A seropozitifliğinin *H.pylori*'ye benzer olması fekal-oral bulaş lehine yorumlanmıştır. Helikobakterler için cinsel yolla bulaş bildirilmemiştir.⁸⁰ Gaita ile kontamine edilmiş sebze, meyve ve deniz kabukluları gibi gıda, su ve lağım sularında gibi çevresel örnekler *H.pylori* bulaşı içi potansiyel kaynak olabilir. Ancak bakterinin canlı formları bu tür örneklerde gösterilememiş, moleküler yöntemlerle DNA'sı tespit edilebilmiştir.⁷⁶

2.8.2 Patogenez

H.pylori patogenezde konak, çevre ve mikroorganizmaya ait çok sayıda faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Tablo 6'da üzerinde en çok çalışılan çeşitli faktörler özetlenmiştir.

Tablo 6. *H.pylori* ilişkili hasarlıkların patogeneğinde çeşitli faktörler.

Etken	Özellik	İlişkili Hastalık
Konak		
Yaş	Erken yaşta enfeksiyon	Peptik ülser ve gastrik kanser
İnflamasyon	Th1 cevabı	Şiddetli inflamasyon
	IL-1B/IL-1RA/TNF-a/IL-10	Kardia dışı gastrik kanser
	polimorfizmi	
Asit sekresyonu	Yüksek	Düodenal ülser
		Gastrik kanser
Çevre		
Sigara		Gastrik kanser
Diyet	Yüksek tuz / Karbonhidrat	Gastrik kanser
	Düşük vitamin C?/B-karoten?	Gastrik kanser?
İlaç	NSAID	Peptik veya düodenal ülser
<i>H.pylori</i>		
<i>cagA</i>	<i>cagA</i> pozitif	Peptik/düodenal ülser, gastrik kanser
	<i>cagA</i> pozitif ve çok sayıda TPM	Gastrik kanser
<i>vacA</i>	<i>vacA</i> pozitif	Peptik/düodenal ülser, gastrik kanser
<i>babA</i>	<i>babA</i> pozitif	Düodenal ülser, gastrik kanser
<i>oipA</i>	<i>oipA</i> ‘açık’	Şiddetli gastritis, duodenal ulcers
<i>sabB</i>	<i>sabB</i> ‘kapalı’	Düodenal ülser, gastrik kanser
<i>iceA</i>	<i>iceA</i> 1 veya <i>iceA</i> 2d pozitif	Peptik ülser/gastrik kanser
<i>Jhp094</i>	<i>Jhp094</i> pozitif	Düodenal ülser
<i>Jhp0950</i>	<i>Jhp0950</i> pozitif	MALT lemfoma
HP-NAP		Nötrofil aktivasyonu

NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; Th1, T-helper cell 1; IL-1b, interleukin-1b; TNFa, tumor necrosis factor a; TPMs, tyrosine phosphorylation motifs.

2.8.2.1. Bakteriye ait virulans faktörleri

Enfekte kişilerin çoğunda, belirgin klinik semptomlar olmamakla birlikte histopatolojik olarak kronik gastrik inflamasyon tablosu karakteristiktir. Fakat kolonize kişilerin % 80-90’ında peptik ülser veya gastrik kansere doğru ilerleme görülmez. Klinik prognoz bozulduğu kişilerde etken faktörlerin tespiti için yapılan çalışmalar devam etmektedir. *H.pylori* suşlarının tam genom dizi analizlerini yapılması, gen ekspresyonunda ve proteomik alanda gelişmelere yol açmış ve patojenite ve/veya virulansla ilgili olduğu düşünülen birçok bakteriyel faktör belirlenmiştir (Tablo 6). Ancak varsayılan virulan faktörlerinin önemini göstermeye yönelik olarak bu güne kadar yapılan çok sayıdaki çalışmada, bunların hiçbirinin tek başına spesifik bir patoloji ile fizyopatolojik ilişkisi açıklanamamıştır.⁸¹

2.8.2.1.1. Kolonizasyon Faktörleri

H.pylori'nin sahip olduğu flajellalar, üreaz enzimi ve hücre yüzeyinde eksprese edilen protein yapıda çeşitli adhezinleri, gastrointestinal sisteme kolonizasyonunda major rol oynamaktadır.

2.8.2.1.1.1 Hareket ve Flagella

Organizmanın sahip olduğu spiral şekil ve altıya kadar olan kılıflı polar flagellalar, *H.pylori*'ye gastrik sıvıda ve mukusta hareket etme kabiliyeti kazandırmaktadır. Üreaz enzimiyle etrafında yeterli miktarda bikarbonat ve amonyak katmanı oluşturarak güvenli bir şekilde gastrik asit bariyeri ve mukus katmanını aşmayı başarmaktadır. Domuz denekleri kullanılarak yapılan hayvan modeli çalışmalarında motilite ve üreaz aktivitelerinin kolonizasyonunda esansiyel olduğu gösterilmiştir.⁸² Örneğin *flgE*, flagellar çengel proteinini kodlamaktadır, bu gende oluşan mutasyonlarda, hareketsiz ve flagellasız bakteriler oluşmakta fakat flagellin sentezine devam edilmesine rağmen kolonizasyonu gerçekleştirememektedirler.⁶⁰

2.8.2.1.1.2 Üreaz Enzimi

Üreaz negatif mutant ve üreaz inhibitörleri ile yapılan çeşitli hayvan denekli çalışmalarda *H.pylori*'nin üreaz enziminin, gastrik mukozal kolonizasyonu sağlamada kritik rolleri olan adaptif bir enzim olduğu belirlenmiştir. Üreaz, üreyi amonyak ve bikarbonata çevirerek asit pH'dan korunmasına yardım etmekte ve bakteriyi çevreleyerek alkali bir katman oluşturmaktadır.⁸³ Bakteri proteinlerinin % 6'sından fazlasını oluşturan üreaz enzimi kofaktör olarak nikel ihtiyacı duyar. *H.pylori*'nin üreaz enzimi 550 kilo dalton (kDa) ağırlığında heksamerik bir moleküldür. 61,7 kDa (α) ve 26,5 kDa (β) ağırlığında iki farklı subünit içerir. Üreaz, kronik *H.pylori* enfeksiyonun bir özelliği olan lamina propriada gözlenen inflamasyona da katkıda bulunmaktadır. Ayrıca *in-vivo* üreaz aktivitesi insan gastrik epitel hücrelerine toksik etki göstermektedir.

2.8.2.1.1.3 Adhezinler

H.pylori'nin konak hücre reseptörlerine bağlanması, bakterinin gastrik lümenin hareketine karşı koyarak kolonizasyonu ve zedelenmiş gastrik epitelyumde doku aralıklarından sızan besin maddelerini kullanabilmesi için ön şarttır. Dizi analizi çalışmaları sonunda bakterinin konak dokuya adezyonuna rol oynayan dış membran proteinleri, (OMP) kodlayan genlerin, tüm ORF'lerin aklaşık olarak %1'ini oluşturduğu gösterilmiştir. Bu OMP'ler adezyonun yanı sıra irekt olarak bkterinin virülansında da rol oynamaktadır. *H.pylori* mide epitel hücrelerine tutunabilmek için en az 5 farklı adhezin kullanmaktadır. Bunlardan BabA, Lewis^x ve Lewis^y, Sialik asit bağlayan adezin, SabA, flagella membranında taşıdığı HpaA proteini, HpQ, OlpA ve dış membranında yer alan HspA daha ilk belirlenen adhezinlerdir.⁸⁴ Buna ek olarak dış membranda, çok azının fonksiyonu belirlenebilmiş, bazılarının ise bakterinin adherens özelliğine katkı sağladıkları gösterilmiş, 19 yeni lipoprotein yapı elemanı tespit edilmiştir. En iyi tanımlanmış *H.pylori* adhezini, seçici olarak gastrik hücre membranı üzerinde yer alan kan grubu antijenleni Lewis^b'ye bağlanan, membran bağlı protein BabA'dır. BabA'nın terminalinde bulunan fukozillenmiş yapılar, gastrointestinal sistem mukozasında ve kırmızı kan hücrelerinde bulunan kan grup antijenlerini taklit etmektedir.⁸⁵ Kan grubu O olan kişilerin peptik ülser ve adenokarsinomaya olan yatkınlığı kan grup O spesifik antijen bağlayan BabA adhezinlerle açıklanabilir. Suşların siyalize glikokonjugantlara bağlanabilme kapasitesi, virulansa ve enfeksiyonun kronikleşmesine katkı sağlamaktadır.

2.8.2.1.2. Konak Savunmasından Korunma Faktörleri

H.pylori; midenin lokal veya sistemik, doğal veya kazanılmış immun cevabından korunacak çok sayıda yapısal elemana, enzime ve toksinlere sahiptir. Bu elemanlar; flagellalar yapı, güçlü üreaz enzimi, katalaz ve süperoksit dismutaz enzimi, adeziv proteinler, musinaz gibi suda çözünür extraselüler mediyatör proteinler ve proliferasyonu inhibe eden proteinlerdir.

2.8.2.1.2.1. Katalaz ve Süperoksit Dismutaz

H.pylori'nin gastrik mukozada canlı kalabilmesini kolaylaştıran diğer adaptif enzimleri ise antioksidan defans mekanizmasında rol oynayan katalaz ve süperoksit dismutazdır. Her iki enzim de bakteriyi lamina propriayı ve epitel hücrelerini infiltre eden nötrofillerden sekrete edilen reaktif oksijen radikalleri olan hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine karşı korumaktadır.⁸⁶

2.8.2.1.2.2. Thioredoksin (CD59)

H.pylori suşları proteinlerin disülfid bağlarını keserek denatüre edebilen Thioredoxin (CD59) enzimine sahiptir. Bu enzim ile mukus tabakasındaki mucusları ve konak tarafından sekrete edilen nonspesifik ve spesifik IgA, IgG ve IgM gibi immunoglobulinleri denatüre ederek vücut savunmasından korunabilmektedirler. *H.pylori* thioredoxin (Trx) 1'in arginaz şeparonu olduğu ve bakteriyi oksidatif ve nitrosatif strese karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir.⁸⁷

2.8.2.1.3. Doku Hasarı Oluşturan Virulans Faktörleri

Mikroorganizma *cagA*, *vacA*, *iceA*, *babA* ve *oipA* gibi virulansta çok değişik ve hayati roller oynayan gen bölgelerine sahiptir.

2.8.2.1.3.1. *cagA* Patojenite Adası (*cagPI*) ve *cagA* Geni

H.pylori suşlarının yaklaşık % 70'inde virulans ile güçlü ilişkisi olan CagA sitotoksin kodlayan *cagA* geni bulunmaktadır ve bu geni taşıyan, yani CagA⁺ olan suşlar Tip1 suş olarak adlandırılmaktadır. *cagA*⁺ suşlar ile ilişkili enfeksiyon riski, çeşitli çalışmalarda değişiklikler göstermektedir. CagA proteini, 128 kDa büyüklüğünde yüksek derecede immünojenik olan ve inflamatuvar cevabı uyaran bir proteindir. *cagA*⁺ pozitif suşlar, artmış inflamasyonun yanı sıra, hücre difererasyonu, ve gastrik mukozanın metaplazisi ile de ilişkilidir.⁸⁸⁻⁹⁰ Fischer ve arkadaşlarının, sadece *cagPI* içeren *H.pylori* suşlarının mide epitel hücrelerinde hücre iskelet değişiklikleri ve NF-κB bağımlı inflamasyonu yapabildiği gösterilmiştir.⁹¹

Çok az sayıdaki çalışmada *cagA*⁺ suşlar ile herhangi bir ilişki bulunamamışken doğu asya kökenli suşlarda CagA varlığı atrofik gastritten gastrik karsinomaya kadar giden gastroduodenal patoloji için en önemli faktördür. Batı kökenli suşlarda CagA'nın *H.pylori*'ye bağlı kanser riskini 2-3 kat artırdığının gösterilmesine karşılık doğu kökenli suşlar için OR oranının 28,4 kadar yüksek olduğu bulunmuştur. (95% CI: 3,7–217,1).⁹² Risk analizinin değerlendirilmesi için CagA sitotoksini ve *cagPI*'in ileri analizi gereklidir.

cagA geni genomik patojenite adası, *cagPI* varlığı için bir marker olarak kabul edilmektedir. *cagPI*, yaklaşık 40 kDa büyüklüğündedir ve 27 gen lokusuna sahiptir. *cagA* pozitif suşların çoğu, tam ve ardışık biçimde yerleşmiş *cagPAI*'e sahiptir. *cagPI* da kodlanan genler *cagPI*'in terminal bölgesinde kodlanan *cagA* geninin kodladığı efektör CagA'proteinini gastrik hücreye transfer eden ve *Agrobacterium tumefaciens*'dekine benzeyen bir Tip-IV sekresyon sistemi (T4SS) kodlamaktadır.^{93,94}

H.pylori T4SS ile CagA'nın yanı sıra immunopatolojide son derece etkin olan Nod1 ilişkili inflamatuvar cevabı aktive ettiği bildirilen bakteriyel peptidoglikanın da hücreye translokalize edildiği gösterilmiştir.⁹⁵⁻⁹⁷ Hücre sitozolüne transfer edilen CagA burada Src kinazlar tarafından fosforile edilir. Src kinazlar hücrede temel sitoskelatal işlemleri, hücresel proliferasyon ve diferansiyasyon kontrol ederler ve karsinogenezde anahtar rol oynarlar. C-Src kinazlarla fosforillenmiş CagA; SHP-2 ve MAPK'ailesi üyesi olan ERK'yı aktive ederek hücre sinyal sistemini bozar, hücrede üreme faktörleri kontrolden çıkmış gibi morfolojik değişim, humbird hücre görünüşü şekillenir.^{98,99} CagA, c-Src reseptörler dışında, onkogeneze rol oynayan bir başka protein kinaz, c-abl kinazlar tarafından da fosforile edilir. Kinazlar dışında c-Met reseptörlerine de bağlanan CagA yine ERK üzerinden hücrede mitojenik cevabı başlatır. Farklı suşlardan izole edilen CagA proteinin c-terminal ucunda farklı sayılarda, EPIYA, tirozin fosforilasyon motifi, TFM, tanımlanmıştır.^{100,101} TFM'lerinin, düşük karsinojenik özelliğe sahip batı kökenli suşlarda büyük ölçüde yapısal değişkenlik gösterdiği, buna karşılık karsinojenik doğu kökenli suşlarda oldukça stabil bir yapıya sahip olan bu motiflerin SHP-2'ye yüksek oranda bağlanabildikleri gösterilmiştir.

CagA'nın N-terminal ucu, tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak epitelyum hücreler arasındaki desmosom ve tight junction proteinlerini hedef almaktadır.¹⁰² Bu bölgede ZO-1, JAM, ve E-cadherin gibi bir çok protein ile kompleksler kurarak hücre

ve mokuza fonksiyonlarını, kavşağın sıklığı ve adherensini, bozar.^{103,104} Sonuç olarak epitelyal polaritenin kaybolur ve transforme karsinoma hücreler invaziv fenotipe benzeyen hücresel davranışlar sergiler.¹⁰² Diğer taraftan E-katherini etkileyen CagA'nın, β -katenin sinyalini bozarak gastrik epitel hücrelerde intestinal diferansiyasyonu ilerlettiği, buna bağlı olarak da karsinogenezis tetiklediği hücre kültürü çalışmaların da da gösterilmiştir.^{104,105} CagA üzerinden gerek sinyal sistemlerinin modifikasyonu gerekse inflamatuvar cevaba bağlı olarak sekrete edilen sitokin baskısı gastrik hücrelerde intestinal veya diffüz tip hücre metaplazisine sebep olmaktadır.^{104,105} Metaplazik değişimlerde CagA'nın muhtemel rolünü tespit amacı ile deney hayvanlı çalışmalarda, mongoliyan gerbillerde CagA⁺ suşların gastrik mukozada insanlardakine benzer şekilde neoplastik transformasyona yol açtığı göstermiştir.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Gerbil modelli bir diğer çalışmada CagA'nın β -katenin yolağını aktive ettiği ve buna bağlı olarak hücre nükleusunda translokasyon görüldüğü, bir başka çalışmada da, cagA veya T4SS foksiyon defisitli mutantların daha ılımlı inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir.^{105,111} CagA'nın DNA işleyen enzim (AID) ekspresyonunu indüklediği ve bununla tümör süpresör P53 geninde mutasyonların yığılmasına yol açtığını ileri süren yayınlarda mevcuttur.¹¹² *cagA* geninin büyüklüğü ve proteini suşlar arasında farklılıklar göstermektedir. Genin 3' bölgesinde tekrar eden sekansların sayısı ile değişen protein varyasyonları görülmektedir. Konak hücresi içerisine enjekte edilen CagA'daki EPIYA motifi trozin fosforilasyonunda hedef bölgedir ve proteinin variable bölgesinde karboksi ucunda 5 amino asit (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) içermektedir.²⁷⁷ Bazı çalışmalar EPIYA motiflerinin sayısının farklı klinik sonuçlarla ilişki olduğunu göstermiştir. Daha fazla EPIYA motifi içeren suşların yüksek seviyede CagA fosforilasyonu ile ve daha fazla sitoskeletal yeniden düzenlemelerle ve dolayısıyla atrofik gastrit ve gastrik kanser ile ilişkili olduğunu düşünülmektedir.^{278,279} Azuma ve ark. atrofik gastritte duodenal ülserden daha sıklıkla izole edilen 4'den fazla EPIYA motifi içeren suşların gastrik kansere neden olan suşlar olduğunu bildirmişlerdir.²⁸⁰

2.8.2.1.3.2. *vacA* (Vakualizasyon Yapan Sitotoksin) geni

H.pylori 60190 (ATCC49503) suşunun sıvı kültür filtratlarında memeli hücrelerinde geniş vakuolizasyona sebep olan bir ekstra sellüler toksin varlığı

gösterilmiştir. Yaklaşık olarak 140 kDa ağırlığında 1,287-amino-asitden oluşan protoksin olarak üretilen ve “vakuolizasyon toksini-VacA” olarak tanımlanan bu protein kromozomda 3864 bp uzunluğunda bir açık okuma bölgesi-ORF- olan *vacA* geni tarafından kodlanmaktadır. *H.pylori* suşlarının tamamında *vacA* geni bulunmasına rağmen suşların yaklaşık olarak % 50’sinde VacA toksini üretilmektedir. Toksin üreten suşlarla toksin üretmeyen suşlar arasında önemli farklılıklar bulunur.^{110,113} *vacA* geni mozaik yapıda olup, heterojenite gösteren 2 gen parçasından oluşur. Genin 5’-amino ucuna yerleşmiş “S” bölgesi sinyal peptidini kodlar ve s1 ve s2 tipleri bulunmaktadır. *vacA* geninin s1 tipini barındıran suşlar aktif toksini sekrete ederler ve hem gastrik ülser hem gastrik kaserle daha yüksek oranda ilişkili bulunmuşlardır. s1 tipi, prognozu etilediği düşünülen, farklı sitotoksik aktivite gösteren s1a, s1b ve s1c allelik tiplerine sahiptir.¹¹⁴ Genin orta bölgesinde bulunan ORF kısımdaki “M” bölgesi ise m1 (m1a ve m1b subtipi) ve m2 tipleri bulunmaktadır. m1 subtipi daha kuvvetli vakuolizasyon aktivitesine sahiptir.¹¹⁵ VacA toksini “sekrete proteinlerin ototransporter ailesi” içerisinde yer alır. Toksinin karboksi terminal ucunda bu aile için spesifik olan fenilalanin rezidü bulunur. Ribozomlarda üretilen protoksin, toksin aminoterminal bölgede yer alan 33 amino asitlik sinyal uç “s” dan ve karboksi terminal uçtan proteolitik enzimler tarafından kesir ve 88.2 ±02 (87-95) kDa ağırlığında 821 amino asit uzunluğunda matür proteine dönüştürülerek hücre dışına sekrete edilir.¹¹⁶ Matur toksinden ayrılan pro-VacA peptidinin karboksi ucu, toksinin bakterinin dış membranından dışarıya ototransportu ile ilgilidir.¹¹⁷ VacA’nın sitotoksik etki göstermesi için bakteriden sekrete edilmesi ve konak hücre sitozolüne aktif formda penetrasyonu gerekmektedir.¹¹⁸ Sekresyon *cagPI*’da kodlanan T4SS ile gerçekleşir. Sekresyon sırasında toksinlerin yaklaşık %50’si bakteri hücre yüzeyi ile ilişkide kalmaya devam eder, kalanı ise ortama serbest bırakılır. Bakteri yüzeyi ile ilişkili olan VacA molekülleri fonksiyonel olarak aktiftir ve konak hücre membranına bağlanan bakteriden T4SS ilerekt olarak konak hücre sitozolüne gönderilir.¹¹⁹ VacA toksini için hedef hücrelerde iki farklı reseptörün varlığı gösterilmiştir. Bunlardan birisi p250 olarak adlandırılan 250 kDa ağırlığında bir yüzey glikoproteini, “reseptör tip protein trizin fosfatase- RPTP-β (PTP β)” dır. Diğer reseptör ise “protein tyrosine phosphatase receptor type Z” “RPTP ζ” (PTPζ) dır. VacA mide epiteline PTP ζ ile bağlanır Mide epitelinde bir PTP ζ substratı olan, reseptör kinaz interaktör-1 ile birleşik G hücre, Git-1in, miktarı artar

yani, trosin fosforilasyonuna sebep olur, Fosforilasyon, gastrik asit sekresyonunu artırarak epitelyumde ayrışmaya ve ülserasyona sebep olur. PTP ζ/β signal sisteminin yol açtığı gastrik epitelyumde hücreler arası ayrışma ve hücre dışı ortamın iyon dengesinin bozulması ülserasyonun mekanizmasını oluşturur. Diğer taraftan TP ζ' nin hücre içi ligantı olan pleiotrophin (PTN)'de gastrik ülser oluşumunu artırır.¹²⁰⁻¹²²

VacA'nın *H.pylori* kolonizasyonu ve infeksiyonun sonucunu değiştirebilecek çeşitli toksijenik özellikleri vardır. VacA'nın en iyi çalışılan etkisi endozomal maturasyon üzerine olan etkisidir ve bu epielyal hücrelerin vakuolizasyonuna yol açmaktadır. VacA'nın endozomal vezikülere eklendiği, klor kanalı aktivitesi ile porlar oluşturduğu, endozom içerisindeki anyonların kompozisyonunu değiştirdiği ve arkasından ozmotik şişmeye yol açtığı düşünülmektedir. Endozom üzerine etkilerine ek olarak toksinin aynı zamanda apoptozis yoluyla konak hücre ölümünü indüklediği ve bunu mitokondriyal membranlardaki por oluşumu yoluyla gerçekleştirdiği¹²³ ve aynı zamanda indirek olarak pro-apoptotik sinyal moleküllerinin aktivasyonu yoluyla yaptığı düşünülmektedir.¹²⁴ Pürifiye vacA direk olarak fare gastrik mukozasına uygulandığında epitelyumda erozyonlara yol açabilmektedir. VacA'nın varsayılan bir hücre yüzey reseptörü "trozin fosfor reseptör tip Z" (Ptpz) proteindir. Ptpz mukoza üzerinde saflaştırılmış vacA'nın erozif etkisi ile ilgili olduğu bulunmuştur. Ptpz defisitli farelerin genetik olarak VacA'nın ülser yapıcı zedelenmesine karşı dirençli olduğu bulunmuştur.¹²⁵ VacA'nın bildirilen başka bir etkisi de hücreleren iyonlar, demir, nikel gibi küçük moleküller, şekerler ve aminoasit kaybına yol açabilme kabiliyetidir. Bu etkiyi kavşak bütünlüğünde majör bozulmalar olmaksızın sıkı kavşakların bariyer fonksiyonunu bozarak yaptığı düşünülmektedir. *H.pylori*'nin epitelyal bariyeri zedeleyerek veya küçük moleküllerin hücre dışına sızıntısına yol açarak besin maddelerini elde ettiği speküle edilmektedir. Son çalışmalar VacA'nın bağışıklık sistemi üzerine olan potansiyel etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. VacA'nın in-vitro'da T hücre aktivasyonunun oldukça güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur.¹²⁶

VacA üretimi ile gastrik ülser gelişimi arasındaki etyolojik ilişkiye ait çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Mongol gerbillerinde *H.pylori* enfeksiyon çalışmasında vacA defektif suşlarla wild-tip suşların benzer inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir. Buna karşılık vacA mutant suşları ile kolonize hayvanlarda gastrik ülserin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu gösterilmiştir.¹²⁷ Başka bir çalışmada fareler hem

H.pylori wild-tip ile hem de *vacA* gen delesyonuna sahip mutantlarla infekte edilmiş, wild-tip bakterinin *vacA* defisitli suşla olan rekabeti kazandığı gösterilmiştir, bu durum kolonizasyonda *vacA*'nın bakteriyi pozitif yönde etkilediğini göstermektedir.¹²⁸

2.8.2.1.3.3. *iceA* Geni (Inducible by Contact with Epithelium Gene)

iceA, gastrik epitel hücre ile temas sonrası uyarılan bir restriksiyon metilasyon genidir. Genin *iceA1*(*hpyI-R*) ve *iceA2* olarak tanımlanan iki allelik tipi bulunmaktadır. *iceA1*'in ürünü olan IceA1, *N.lactamica*'nın restriksiyon enzimi NlaIII ile büyük oranda homoloji gösterir Bazı suşlarda *hpyI-M* korunmuş olmasına karşılık *hpyI-R* mutasyona uğramış ve *iceA2* gen alleli ortaya çıkmıştır. *H.pylori* suşlarında *iceA2* giderek *iceA1*'in yerini almaya başlamıştır. Ancak bu allellerin virulansa katkıları ve klinik önemleri tartışılmaktadır. Amerika ve Hollanda gibi batı toplumlarından izole edilen suşlarda *iceA1* varlığı peptik ülser ve gastrik karsinomalar için önemli bir risk faktörü olarak görülürken, Japonya, Çin, Kore; Kolombiya ve Teksas'da yapılan çalışmalarda böyle bir ilişki kurulamamıştır. Koehler ve arkadaşları *iceA1* allelinin ülser ve gastrik karsinomalı ve MALT lenfomalı hastalardan izole edilen suşlarda, gastritli hastalardan izole edilen suşlara göre 3,6 kat, *vacAs1* alleli ile birlikte ise 5,6 kat daha yüksek prevalansta görüldüğünü bildirmişlerdir. *iceA* geninin diğer genotipi olan ve görülme sıklığı giderek artan *iceA2* geni daha çok gastritli veya non-ülser dispepsili hastalardan izole edilen suşlarda görülmektedir. Ancak Çin ve Asya kökenli suşlarda *iceA* allellerinin spesifik bir patoloji ile ilişkisi gösterilememiştir. Ashour ve arkadaşları da Brezilya kökenli 142 hastadan izole ettikleri *H.pylori* suşlarında *iceA* allellerinin görülme sıklığını ve bunların muhtemel klinik yansımalarını araştırmışlar, sonuçta *iceA*'nın klinik fark gözetmeksizin izolatların %90'ından fazlasında bulunduğunu, sıklığın 7 yaş üzerindeki hastalarda daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir.

2.8.2.1.3.4. *babA* geni

H.pylori genomunda iki ayrı *babA* geni bulunmaktadır. *babA1* hemen hemen tam bir ORF içermektedir fakat translokasyon için gerekli olan başlangıç bölgesine sahip değildir ve translokasyon gerçekleşmez. İkinci form *babA2* ise 5' ucunda 10bp'lik

insersiyon ve ATG başlangıç kodonu içermekte olup bağımsız olarak ORF ekspresyonunu gerçekleştirebilmekte ve gastrik hücre üzerinde yer alan kangrubu antijeni Lewis^b'ye bağlanan, membran bağlı bir adezin olan BabA proteinini kodlamaktadır. *cagA* ve *vacA* pozitif olan Tip-1 suşlarının *babA* geni taşımaları halinde duodenal ülser ve gastrik adenokarsinom riskinin yükseldiği,¹²⁹ *bab2A*⁺ geni taşımaları halinde ise glandular atrofi, intestinal metaplazi ve artmış epitelyal hücre proliferasyonu ve gastrik kanser riskinin arttığı bildirilmiştir.

Bu genler dış membran proteinleri ailesi içerisinde yer alan ve *H.pylori* suşlarının gastrik epitel yüzeyindeki Lewis^b kan grubu antijenlerine bağlanmasını sağlayan proteinleri kodlarlar. Bu proteinler sayesinde bakteri mide peristaltizmi ve ortamın asidine karşı korunur. Lewis^b ye bağlanmada daha etkin olduğu düşünülen *babA* aynı zamanda flagellindir. Yapılan çeşitli çalışmalarla 5'i *babA*'da (AD1, AD2, AD5) 3'ü de *babB* geninde (BD1, BD2 ve BD3) olmak üzere 8 allel belirlemişlerdir. Bu allelik farklılığın coğrafi ve etnik bir temeli olmadığı gibi Lewis^b antijenine bağlanmada da bir farklılık yaratmadıklarını bildirilmiştir.

2.8.2.1.3.5. *oipA* (Outer Inflammatory Protein) Geni

H.pylori hücre duvarında yer alan *oipA* (HP0638) geninin kodladığı OipA proteininin, *cagPAI* gibi IL-8 ekspresyonunda rol oynar. OipA'nın inaktivasyonu ile IL-8 üretiminin % 40 oranında azaldığı gösterilmiştir. *oipA* geni ile birlikte *cagPI*'da eksprese edilen CagE'nin inhibisyonu halinde IL-8 üretiminin tamamen durduğu gözlenmiştir. Moleküler bazlı çalışmalarda OipA'nın NF-κB ve AP-1 gibi IL-8 aktivasyonu için gerekli olan ISRE'nin aktivasyonunda rol oynayan STAT-1'i aktive ettiği gösterilmiştir. *oipA* pozitif suşların duodenal ülserle ilişkili oldukları ileri sürülmüştür.^{130,131}

2.8.2.1.3.6. Diğer Gen Bölgeleri

Gastrik karsinomali hastalardan izole edilen suşlarda esnek bölge *-plasticity region-* olarak tanımlanan ve *H.pylori* genomundaki en değişken bölgeyi oluşturan yeni bir ORF bölgesi gösterilmiştir. Büyüklüğü suşlar arasında değişiklik gösteren (J99

suşunda 45 kb ve 26695 suşunda ise 68 kb) bu bölgelerde kanser oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen genler, *JHP940* ve *JHP947* ile gastritle ilişkili olduğu düşünülen ve sadece 26695 suşunda gösterilen bir gen, (*HP986*), yer almaktadır. Brezilya’da gastrik kanser, ülser ve gastritli hastalardan izole edilen 200 suş ile yapılan PCR bazlı çalışmada sadece *JHP947* genine sahip suşların kanser ve ülser ile ilişkili oldukları gösterilmiş, diğer iki genin hastalığın prognozuna etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.¹³² Ancak *JHP947* geninin *cagA* ile birlikteliğine dikkat çekilmiş ve bu yeni genin *vacA* ve *cagA* ile birlikte önemli bir virulans faktörü olabileceği ileri sürülmüştür.¹³²

H.pylori *pldA* ve *pldC* genleri tarafından kodlanan PldA ve PldC proteinleri fosfolipaz aktivitesine sahip olup, mide mukusunun apikalindeki fosfolipidden zengin tabakayı tahrip ederek, mikroorganizmanın gastrik hücreler arası bağdokuya ulaşmasına yardım eder.¹³³

HP-NAP (nötrofil adeziv protein) olarak tanımlanan ve bakterioferritin gen ailesinden, *napA* geni tarafından kodlanan 150 kDa bir büyük protein, nötrofillerin yüzeyinde CD11b ve CD18 ekspresyonunu artırarak, nötrofillerin endotel hücreye bağlanmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir.

2.8.2.2. Hastaya Ait Faktörler

Son yıllarda kişilerin sahip olduğu genotipik özellikler, örneğin polimorfizmler (IL-1 β , IL-RN ve TNF- α), diyet alışkanlıkları ve sigara kullanım gibi çok çeşitli hastaya ait faktörlerin, enfeksiyonun seyri ve patogenezdaki rolleri aydınlatılmaya başlanmıştır.

2.8.2.2.1.Doku polimorfizmi

Günümüzde gastroduodenal hastalıkların patogenezinde rol oynadıkları düşünülen birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Konağın adaptif ve doğal immün sistemlerinde (örn: IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-8, TLR4, Mannoza bağlayan lektin) oluşan çeşitli allelik kombinasyonlar inflamatuvar sürecin şekillenmesini direk olarak etkileyerek enfeksiyonun ülser, gastrit, premalign ve malign dönüşümüne etki etmektedirler. Bu polimorfik bölgelerden *IL-1B* sistemine ayrıntılı olarak değinilecektir.

2.8.2.2.1.1. IL1 sistemi

Tanımlan ilk sitokin olan IL-1, monositler, makrofajlar, trombositler ve hasarlanmış endotel gibi birçok hücrelerden salınmaktadır ve hemen hemen tüm doku ve organ sistemlerinde çeşitli etkileri olan polipeptid yapıda bir moleküldür. IL-1 hem akut ve hem de kronik inflamasyonu indükleyen proinflamatuvar sitokinlerin prototipidir ve prototipik alarm sitokini olarak da adlandırılmaktadır. IL-1; IL-1 α ve IL-1 β iki alt gruplarından oluşmaktadır. IL-1 α sıklıkla dolaşımda bulunmaz ve hücre lizisi esnasında hücrelerden salınan inflamatuvar bir protein olarak görev yapmaktadır. Bununla birlikte IL-1 β ekstrasellüler ortama salınmaktadır. IL-1 β hedef hücrede gen ekspresyon düzeyini artırarak veya azaltarak diğer sitokinlerin ve proteinlerin sentezini etkilemektedir. IL-1, immün sistemdeki etkisini T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar ve kemik iliği hücreleriyle etkileşime girerek gerçekleştirmektedir. Bu fonksiyonlar hücre yüzeyinde bulunan IL-1 Reseptörü (IL-1R)'ne bağlanılarak gerçekleştirmektedir. IL-1R reseptörlerin iki tipi tanımlanmıştır (IL-1RI ve IL-1RII). Endotel, mide ve diğer birçok dokuda IL-1RI saptanırken, IL-1RII B ve T lenfositlerde bulunmaktadır. Bir denge mekanizması olarak IL-1'in bu güçlü inflamatuvar etkisi, yapısal olarak benzer bir molekül olan IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) ile antagonize edilmektedir. IL-1RA'yı kodlayan gen, *IL-1RN* olarak adlandırılmaktadır ve IL-1 β 'yı kodlayan gen ise *IL-1B* geni adlandırılmaktadır. IL-1RA ve IL-1'in her ikisinde aynı reseptöre bağlanmakta ve kompetitif inhibisyon ile IL-1'in etkileri antagonize edilmektedir. Çeşitli çalışmalarla IL-1RA plazma düzeylerinin immünolojik, infeksiyöz ya da travmatik durumlarda belirgin olarak arttığı belirlenmiştir ve IL-1Ra, akut faz proteini olarak kabul edilmiştir.¹³⁴

2.8.2.2.1.2. IL-1B polimorfizmleri

Kromozom 2q'ya yerleşmiş olan *IL-1B* geni içinde promotor bölge üzerinde -511, -31. bazlarda ve 5. ekson içinde +3953. pozisyonlarda tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tanımlanmıştır¹³⁵ (Şekil 2). Yine 2. kromozamda bu bölgelere ardışık yerleşimli IL-1Ra geni bulunmaktadır. İnterlökin 1B geni (*IL-1B*) ve interlökin 1 reseptör antagonist geni (*IL-1RN*) kromozom 2q14 üzerinde 360-kb bir bölgede

yerleşmiştir.[6]. *IL-1B* geni ve *IL-1RN* geni yüksek polimorfizme sahiptir. -31 ve -511. bazlarında görülen polimorfizm CC, CT ve CT şeklindedir. Gen polimorfizmine bağlı oluşan IL-1 sistemindeki değişikliklerin inflamatuvar hastalıklarda etkili olabileceği tespit edilmiştir. Sitozin-Timin (C/T) mutasyonlarının görüldüğü IL-1 β -511 ve -31 polimorfizmlerin kompozisyonu ile sistemik lupus eritematosus, romatoid artrit gibi çeşitli otoimmün hastalıklarla ve kronik atrofik gastrit, duodenit, gastrik adeno¹³⁶ karsinoma gastroduodnal patolojiler arasındaki ilişkisi incelenmiştir. IL1B'nın gastrik asit sekresyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmesi ile allellerin IL1B üretimini downregüle etmesi ve böylece gastrik asit sekresyonunun indüklenmesi bazı allelerin duodenal ülser için risk allelleri olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak bu durumun tam tersi durumlarında ise kronik atrofik gastrit ve gastrik kanser lehine doğru gidişat olmaktadır.

H.pylori ile enfekte *IL-1B* -31 CC genotipine sahip kişilerde daha az IL1- β sekrete edildiği, midede hidroklorik asit seviyelerinin yükseldiği ve duodenal ülserle duyarlı oldukları bildirilmiştir.¹³⁷ -511 TT, -31 CC genotipleri, *H.pylori* ile enfekte ve duodenal ülserli kişilerde, normal mukozalı *H.pylori* ile enfekte kişilerden daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Bununla birlikte gastrik kanser hastalarında homozigot IL-1B-511T/T genotipi taşıyıcılarında malignensi gelişimi için anlamlı oranda artmış risk belirlemiştir.^{138,139}

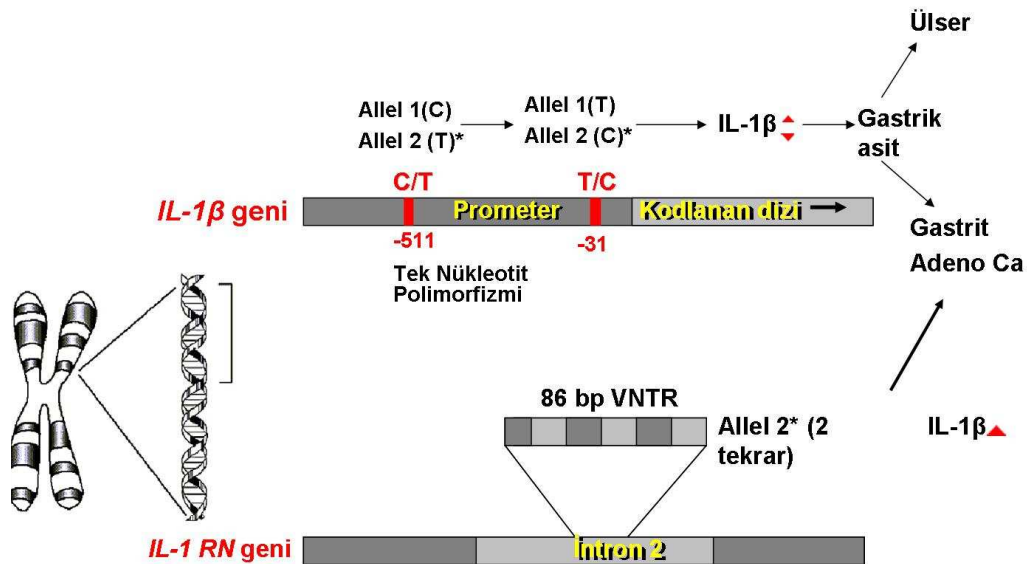
2.8.2.2.1.3. *IL-1RN* polimorfizmleri

IL-1RN geninin 2. intronu 86 bp'lık “*Variable Number of Tandem Repeats*” VNTR (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar) dizilimine sahiptir. VNTR tekrar sayısına göre farklı alleller ve polimorfizm çeşitleri oluşmaktadır (Şekil: 2 ve 3). Örneğin ikinci intron içine 86-bp dizisinin dört tekrarının girmesi ile 410 bp uzunluğunda IL-1RN1 oluşurken; 86 bp dizisinin iki tekrarının girmesi 240 bp uzunluğunda IL-1RN2 oluşumu ile sonuçlanır. 86 bp dizisinin beş, üç ve altı tekrarlarının girmesiyle ise sırasıyla IL-1RN3, IL-1RN4 ve IL-1RN5 olarak tanımlanan alleller belirlemiştir.¹⁴⁰ Diğerlerinden daha sık görülen allel IL-1RN1 diye adlandırılmıştır, diğer allel ise IL-1RN2 alleli olarak adlandırılmıştır.

Bununa birlikte IL-1 RN de çok çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Örneğin farklı intron ve eksonlarda birçok tek baz çifti (SNP) mutasyonu sonucu şekillenen polimorfizmler tanımlanmıştır.

IL-1RA ve IL-1 seviyeleri inflamasyon varlığında normal şartlara kıyasla yüksek seyretmektedir. IL-1RN polimorfizmindeki 1L-RN2 allelinin (2*/2*), monositlerde IL-1RA sentezini arttırdığı düşünülmektedir.¹⁴¹ IL-1RN1 homozigot bireylerle karşılaştırıldığında, IL-1RN2 homozigot bireylerde endotelden salınan IL-1RA düzeylerinin 2-3 kat daha az olduğu bulunmuştur.¹⁴² Allel 2 için homozigot olan bireylerde (2*/2*), kronik inflamatuvar hastalıkların daha uzun sürdüğü ve şiddetli inflamatuvar immün cevap geliştiği tespit edilmiştir. IL-1RN2 genotipi ülseratif kolit, lupus eritematosus, Crohn hastalığı, ankilozan spondilit gibi otoimmün hatalıklarla ve osteoporoz, koroner arter hastalığı ile ilişkili bulunmuştur.¹⁴³

2000 yılında El-Omar ve arkadaşlarının gastrik kanser ve poimorfizm arasındaki pozitif ilişkinin varolduğunu bildirmesiyle IL-1B ve IL-1RN genleri araştırmaların odağı haline gelmiştir.^{144,145} IL-1B-511T ve IL-1RN2 polimorfizminin *H.pylori* varlığında veya yokluğunda gastrik kanser riskini artırmaya meyilli olduğu bulunmuştur.¹³⁸



Şekil 2: IL-1B ve IL-1RN genlerinin 2. kromozom üzerindeki yerleşim yerleri ve polimorfizmin IL-1 sistemine etkisi.

2.8.2.2.1.4. *H.pylori* ile indüklenmiş gastrik patolojilerde IL-1 gen kümesinin ve çeşitli polimorfizmlerin rolü

Bakteri ve konak genetik faktörlerinin kompleks etkileşimi, çevresel faktörlerle beraber kişilerde farklı klinik sonuçların oluşmasını belirlemede önemli roller oynamaktadır. İlginç olarak bakteri enfeksiyonu sonucu oluşan iki ayrı gastrointestinal hastalık olan ülser ve gastrik kanserde gastrik asit sekresyon düzeyi zıt olarak etkilenmektedir. Yüksek asit sekresyonu duodenal ülsere yol açarken, gastrik kanserde düşük asit sekresyonu ve parietal hücre kaybı görülmektedir.

Gastrik mukozada sekrete edilen proinflamatuvar sitokin olan IL-1 ve TNF α *H.pylori* enfeksiyonunda inflamatuvar cevabı başlatma ve güçlendirmede anahtar rol oynamaktadır. Kromozom 2q üzerindeki IL-1 gen kümesi 430 kb'lık bir bölgede birbiri ile ilişkili 3 gen içermektedir: *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-1RN*. Bu genler sırayla IL1 α , IL1 β ve endojen reseptör antagonisti IL-1 RA'yı kodlarlar. IL-1 β gastrik asitin potent bir inhibitörüdür ve *H.pylori* enfeksiyonunda gastrik alanda modülasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. *IL1B* gen bölgesinde transkripsiyonun başlangıç bölgesinde hepsi C>T baz transizyonunu sergileyen 3 biallelik polimorfizm bildirilmiştir: -511 C>T, -31C>T, +3954 C>T. *ILRN* bu genin 2. intronunda 86 bp'lik pentaallellik değişik sayılarda ardışık olarak tekrar eden bölgelere (VNTR) sahiptir. Bu allelin iki tekrarına sahip olan polimorfizm 2*/2* alleli olarak numaralandırılmıştır. Bu polimorfizmin *H.pylori*'ye inflamatuvar cevapta mukozal IL-1 β üretimi anlamlı derecede etkilediği bildirilmektedir.^{146,147}

IL-1 β 'nın gastrik asit sekresyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmesi ve bazı allellerin IL-1 β üretimini downregüle etmesi ve böylece gastrik asit sekresyonunun indüklenmesi duodenal ülser için risk allelleri olarak düşünülürken bunun tam tersi durumlarda IL-1 β üretimini aşırı tetikleyen polimorfizm durumlarında hipoklorhidri ve atrofik gastritin tetiklediği neoplastik dönüşümde artma gözlenmektedir.¹⁴⁷ İlk olarak El-Ömer ve arkadaşları proinflamatuvar IL-1 gen kümesi polimorfizmlerinin *H.pylori* varlığında kanser prekürsörleri ve gastrik kanser riskini artırdığını ileri sürmüşlerdir.¹⁴⁴ *IL-1B-31*C* veya -511*T ve *IL-1RN*2*/2* genotipine sahip bireylerin *H.pylori* enfeksiyonuna cevap olarak hipoklorhidri ve gastrik atrofi geliştirme risklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu riskin aynı zamanda daha az proinflamatuvar genotipe sahip

olan bireylerle kıyaslandığında gastrik kansere yol açma olasılığını 2-3 kat artırdığı bulunmuştur.^{144,145}

Ek olarak proinflatuar IL-1 genotiplerin (*IL-1B-31C* veya -511*T ve *IL-1RN*2/*2*) hem intestinal hem de diffüz tip gastrik kanser riskini artırdığı fakat sıklıkla malignensi riskinin non-kardia bölgesiyle sınırlı olduğu bildirilmektedir. IL-1 markerlarının kardial gastrik adenokarsinom, özefagial adenokarsinom veya özefagial skuamöz hücreli karsinom üzerine etkilerinin olmadığı bildirilmiştir.¹⁴⁹ Son bulgular bu riskli polimorfizmlerin, gastrik kanserdeki etkilerinin gastrik asit sekresyonunda azalma gibi düşünülen çeşitli patolojik mekanizmalarla bütünüyle uyumlu olduğu şeklindedir. Sonuç olarak yüksek seviyede ki *IL-1B* genotipi, hipoklorhidri ile karakterize olan non-kardia gastrik kanser riskini artırırken bazı kardial kanserler veya özefagial adenokarsinoma gibi fazla asit çıkışı ile ilişkili kanserler üzerine hiçbir etkisinin olmadığı düşünülmektedir. İlginç olarak *IL-1B* proinflatuar genotipleri erozif ve nonerozif özefajit gelişimine karşı koruduğu bunu ise korpus atrofisi yolu ile gastrik asiditeyi azaltarak gerçekleştiği düşünülmektedir.^{150,151}

IL-1 gen küme polimorfizmi ile gastrik kanser ve prekürsörleri arasında ki ilişki beyaz, Asyalı ve Latin Amerikan popülasyonları içeren gruplarda birbirlerinden bağımsız olarak yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Machado ve arkadaşları proinflatuar IL-1 genotipleri ve *H.pylori*'ye ait bakteriyel virulans faktörlerinin (*cagA* pozitif, *vacA s1* ve *vacA m1* pozitif) gastrik patoloji gelişimi üzerine kombine etkilerini rapor etmişlerdir.¹⁵⁵ Yapılan çalışmalarda her bir bakteriyel/konak genotipi kombinasyonu için risk değerlendirmesi yapıldığında, gastrik karsinoma bulunma olasılığının hem bakteriyel hem de konağa bağlı yüksek risk genotiplerinde en yüksek seviyede olduğunu göstermişlerdir.¹⁵⁶ Bu durum konak ve bakteri ilişkisinin gastrik kanser patogeneğinde ki önemini göstermektedir.

Bununla beraber duodenal ülserli ve gastrik kanserli hastalarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *IL1B* polimorfizminin farklı popülasyonlarda değiştiğini göstermektedir. Özellikle Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda IL-1 markerları ve gastrik kanser riski arasında ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmaların bazılarının güç düzeyi düşükken bir kısmı uygunsuz kontrol kullanmışlardır. Bununla beraber bazı zayıf çalışmalar çıkartılsa bile gene de tüm Asyalı veya beyaz popülasyonların yayınlanmış proinflatuar *IL-1* polimorfizimleri ile ilişkili gastrik kanser

predispozisyonu göstermediklerine dair bir izlenim bulunmaktadır. Gastrik kanserin popülasyondaki prevalansının önemine işaret eden üç meta analiz yayınlanmıştır. Bunlardan ikisi IL-1 proinflatuar genotiplerinin gastrik kanser riskini artırdığı yönünde sonuçlanmıştır.^{157,158} Bu bulgular *H.pylori*'nin indüklediği gastrik kanser ve prekürsörlerinin patogeneğinde IL-1β'nın en önemli sitokin olduğuna ve genlerdeki varyasyonlarının da bu etkiyi yönlendiren konak genetik faktörleri olarak görev aldığına işaret etmektedir.

H.pylori'nin indüklediği gastrik karsinogeneğinde IL-1β'nın kuvvetli rolünü doğrulayan en önemli kanıtlardan biri H+/K+ ATPaz β promoter ile mideyi hedefleyen IL-1 β'nın normalden fazla üretiminin olduğu transgenik fare modelinden gelmektedir.¹⁵⁹ Bu modelde IL-1β'nın midede sınırlı olarak normalden fazla eksprese edilmesi ile transgenik farelerde gastrik aist miktarında düşme olmakta, bu da atrofi, intestinal metaplazi, displazi ve adenokarsinoma ile devam eden şiddetli gastrit gelişimine neden olmaktadır. IL-1β, transgenik farelerde insan gastrik neoplaziye benzer birçok basamaklı bir prosese yol açmaktadır. Bu değişikliklerin *H.pylori* enfeksiyonu yokluğunda dahi olduğu ancak *H.pylori* ile temas durumunda bu tür anomalilerde ivmelenme olduğu tespit edilmiştir.

2.8.2.2.1.5. Diğer sitokin gen polimorfizmlerinin rolü

IL-1 gen küme polimorfizminin gastrik kanser için risk faktörleri olarak identifiye edilmelerinden hemen sonra TNF-α proinflatuar genotipleri ve IL-10, non-kardia gastrik kanseri için bağımsız olan ek risk faktörleri olarak bildirilmişlerdir.¹⁴⁸ TNF-α, *H.pylori* enfeksiyonuna cevap olarak gastrik mukoza tarafından üretilen diğer bir güçlü proinflatuar sitokindir. IL-1β gibi her ne kadar daha zayıf olmakla birlikte, gastrik asit üzerine inhibitör etkisi bulunmaktadır.¹⁵¹ TNF-A-308 G>A polimorfizminin bir dizi inflammatuar durumlar içerisinde rolü olduğu bilinmektedir. Proinflatuar A alleli taşıyıcılığı non-kardia gastrik kanser oranını 2,2 (%95 GA: 1,4-3,7)'ye yükseltmektedir. TNF-A-308 G>A polimorfizminin gastrik kanserdeki rolü çeşitli çalışmalarla da doğrulanmıştır.¹⁴⁹

IL-10, IL-1 β, TNF-α, interferon γ ve diğer proinflatuar sitokinleri down-regüle eden anti-inflatuar bir sitokindir. IL-10'nun görece olarak eksikliği,

H.pylori'ye cevap ile beraber gastrik mukozada Th-1 hiperinflamatuvar cevabıyla daha büyük hasar ile sonuçlanabilmektedir. Düşük *IL-10* ATA haplotipindeki homozigotluk (pozisyon -592, -819 ve -1082'deki üç promoter polimorfizmleri temel alınarak) non-kardia gastrik kanser risk olasılığını 2,5 oranında artırdığı (% 95 GA: 1,1-5,7) bildirilmiştir.¹⁴⁸

Konakta çok sayıda proinflamatuvar genotiplere (*IL-1B*-511*T, *IL-1RN**2*2, *TNF-A*-308*A, ve *IL-10* ATA/ATA) sahip olmanın non-gastrik kanser riski üzerindeki etkilerini araştırılmış ve kişide bu polimorfizmlerin 3 ya da 4 ünün varlığında gastrik kanser riskinin 27 kat daha fazla olduğunu bildirilmiştir.¹⁴⁸ Bu polimorfizmlerin malignensi ile olan ilişkilerinde *H.pylori* varlığının ön şart olması, inflamasyonun karsinogenezis gelişimine yol açtığı gerçeğini göstermektedir.

H.pylori'nin indüklediği hastalıkların patogeneğinde merkezi rol oynayan bir diğer önemli sitokin de *IL-8*'dir. Bu kemokin CXC ailesine aittir ve nötrofil ve lenfositler için potent bir kemoatraktandır. Ayrıca hücre proliferasyonu, migrasyonu ve tümör anjiyogenezisi üzerine etkileri bulunmaktadır. Genin -251 pozisyonunda (*IL-8*-251 T>A) iyi bir şekilde tespit edilmiş promoter polimorfik bölgesi bulunmaktadır. A alleli taşıyıcılarında *H.pylori* ile infekte gastrik mukozada *IL-8* üretiminde artma olduğu tespit edilmiştir.¹⁶⁰ Aynı zamanda Beyaz ve Asya popülasyonlarında şiddetli inflamasyon ve prekanseröz gastrik anomali risklerini artırdığı bulunmuştur.^{160,161} Fakat bazı Asya popülasyonlarında da aynı polimorfizmin sadece gastrik kanser riskini artırdığı bulunurken¹⁶² beyaz popülasyonda belirgin bir etkisi bulunmamıştır.¹⁶⁰

2.8.2.3. Çevresel faktörler, Beslenme alışkanlıkları ve sigara

Gastrointestinal hastalıkların gelişiminde sigara ve beslenme alışkanlıkları önemli rollere sahiptir. Alkol ve kötü beslenme alışkanlıkları direkt olarak mide mukozasında inflamasyona yol açabilmektedir. *H.pylori* ile kornik olarak enfekte mide mukozasına sahip kişilerin alkol, sigara ve nitrozamin gibi çeşitli karsinojenlere maruz kalması patolojinin neoplastik transformasyona doğru gidişatını kolaylaştırmaktadır.

2.9. İmmünite

H. pylori ile enfekte konakda güçlü lokal immün yanıtlara oluşmasına rağmen, bakteri geliştirdiği çeşitli mekanizmlarla enfeksiyonu yıllarca sürdürebilme kapasitesine sahiptir.¹⁶⁸ Oluşan immün yanıtlar bakteriyi yerleştiği bölgeden uzaklaştırmak yerine enfekte bireylerde görülen midedeki mukozal patolojilere neden olmaktadır. Bakteri, çoğu gastrointestinal patojenlerin davranışından farklı olarak, mide epitelyal hücrelerine invaze olmamaktadır fakat hücrelerin dış yüzeylerine adezyon gösterebilmektedir.¹⁶⁹

Çeşitli çalışmalarla, *H. pylori*'ye karşı oluşan özgül antikorların korunmada kritik rol oynamadığı gösterilmiştir.¹⁷⁰ *H. pylori*'ye sekonder gelişen gastritde, Th1 tip immün cevabın dominant olduğu gözlenilmiş ve T hücrelerince üretilen sitokinlerin nötrofil ve mononükleer hücre infiltrasyonunda esas rol oynadığı öngörülmüştür. *H. pylori*'nin mide mukozasına kolonizasyonu ile konağın doğal savunma sistemi aktive olmakta ve sonrasında enflamasyon öncüsü ve antibakteriyel faktörlerin salınımı artmaktadır. Bunlardan; TNF- α , IL-1, IL-6 gibi sitokinler NF κ B ve STAT3 aktivasyonunu uyarırlar ve hücre proliferasyonunu uyarıcı, apoptozisi inhibe edici etkilerini ortaya çıkarırlar. Midenin epitelyal apoptozisi mukozada programlı bir fizyolojik olaydır ve hücre proliferasyonu ile bir denge içerisinde hücre döngüsünü regüle eder. Apoptozisde azalma veya hücre proliferasyonundaki artma gibi nedenlerle bu dengenin bozulması mide karsinogenezisinde önemli bir rol oynar.¹⁷¹ STAT3 aktivasyonu çekirdek içi β -katenin birikimini hızlandırır. Th1 tip sitotoksik hücrelerin uyarılması ile de sitotoksik sitokin olan INF- γ yapımı uyarılır ve epitelyal hücre döngüsünün artması ile mide karsinogenezisine zemin oluşur.¹⁷² *H. pylori*'ye karşı konağın yanıtında doğal bağışıklık sisteminin önemi aşıkardır. Konağın genetik yatkınlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda; IL-1, IL8 ve metalloproteinazlar gibi inflamasyonun başlamasından sonra devreye giren sitokinler çalışılmış ve bunlar ile hastalığın şiddeti arasında ilgi kurulmuştur.¹⁷³ Doğal yanıt, konakçının mikroorganizmalar üzerindeki, kendisine yabancı "patojene eşlik eden moleküler kalıpları" (PAMPs) tanınması ile başlar. Bakteri duvar komponentleri, flagellalar, nükleik asit yapıları PAMPs'lar arasında sayılabilir. PAMPs'lar patojen tanıma reseptörleri (PRRs) tarafından tanınırlar.¹⁷⁴

Toll benzeri reseptörler (TLR) ve Nod benzeri proteinler PRRs'i oluştururlar. TLR'ler transmembran proteinler olup, Nod benzeri proteinler hücre içindedirler.¹⁷⁵ *Cag* *PaI* pozitif *H. pylori* suşları tarafından T4SS yolu ile epitel hücresi içine injekte

edilen peptidoglikan, Nod1 tarafından tanınır ve Nod1'in tetiklediği enflamasyon süreci başlar. Nod1'in aktivasyonu ile NFκB aktive olur ve sonrasında JNK yolağının da devreye girmesiyle, Nod1 uyarılması sonrası apoptozis tetiklenir.¹⁷⁶ Nod1'in *H.pylori* enfeksiyonundaki savunmadaki rolünün önemi, Nod1 eksikliği olan farelerde *H.pylori*'nin oral kontaminasyonu sonrası, diğer eksikliğin olmadığı farelere göre enfeksiyona yatkınlıklarının arttığının gösterilmesiyle anlaşılmıştır. Ek olarak, eksikliğin olduğu farelerde enfeksiyonun gelişmesinden bir ay sonra midede 100 kat fazla bakteri tespit edilmiştir.¹⁷⁷ Ayrıca Nod1 eksikliği olan farelerde *H.pylori*'e karşı antijen özgül Th1 cevap verme kapasitelerinin de bozulduğu ve dolayısıyla enfeksiyonu ortadan kaldıramadıkları da başka bir çalışmada gösterilmiştir.¹⁷⁸ Achyut ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada TLR-4'ün Thr399Ileu varyasyonunda bakteri lipopolisakkaritlerine karşı doğal bağışık yanıtın azaldığı ve dolayısıyla bakterinin mide ortamında daha uzun süre kaldığı gösterilmiş. Bu çalışmaya göre, süregelen enfeksiyon IL-8 gibi kemoatraktan proteinlerin artmış ekspresyonuna ve epitel hücre hasarı ile mide epitelinde serbest radikallerin artışına neden olmakta, mide kanser öncüsü lezyonlarına özellikle de kronik gastritden, atrofik gastrit ve metaplaziye geçişte zemin hazırlamaktadır.¹⁷⁹ Defensinler de *H.pylori*'e karşı oluşan immün yanıtın içindedirler. *Human-β defensin 2* (hBD2), nötrofil kaynaklı alfa defensinler 1, 2 ve 3 *H.pylori* ile enfekte kişilerin mide sıvısında artmış düzeydedirler.¹⁸⁰ Boughan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da hBD2'nin mide epitelyal hücrelerinde ekspresyonunun Nod1 ve CagPaI bağımlı olduğu gösterilmiştir.¹⁸¹ *H.pylori* mide epiteline yapışınca, epitel hücrelerinden salınan sitokin ve kemokinler granülositlerin, monositlerin ve lenfositlerin enflame mukozaya gelmesine neden olurlar. İnfiltrate eden hücrelerin yoğunluğu arttıkça da daha ciddi enflamatuvar patolojiler oluşur.¹⁸² *H.pylori*'de mevcut olan farklı bileşenler de nötrofil ve diğer enflamatuvar hücreleri uyarırlar. Örnek verecek olursak; *H.pylori* ısı-şok proteini monositlerden TLR-2 yoluyla IL-8 salınımını uyarır.¹⁸³ *H.pylori* nötrofil aktive edici protein endotel hücrelerine nötrofil adezyonunu sağlar, reaktif oksijen radikallerinin yapımını, doku faktörü ve plasminojen aktivatör inhibitörü salınımını uyarır.¹⁸⁴

2.9.1. *H.pylori*'ye karşı doğal immün cevapta polimorfizmin rolü

İnflamatuvar sitokinlerdeki genetik polimorfizmlerin, *H.pylori*'nin indüklediği gastrik adenokarsinoma riski üzerinde önemli rolleri olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, başlangıçta *H.pylori*'ye karşı konağın cevabı, doğal immün cevap şeklindedir. İmmün sistemin bu koluna ait fonksiyonel genlerdeki anlamlı polimorfizmlerin enfeksiyona karşı konağın cevabının büyüklük ve yönünü etkileyecektir. *H.pylori* genellikle gastrik mukozaya invaze olamaz, ancak hücre yüzeyindeki protein kinazlar/taşıyıcı proteinler ile teması inflamatuvar cevabı tetiklenmektedir. LPS reseptörü olan Toll-like reseptör 4 (TLR 4), *H.pylori* için gastrik epitel hücreleri üzerinde potansiyel sinyal reseptörü olarak ilk identifiye edilen yüzey proteindir.¹⁶³ TLR4, günümüze kadar 11 üyesi tespit edilen ve patojenlere karşı cevapta proinflamatuvar sinyal yollarını aktive eden örnek tanıyıcı reseptörlerin bir ailesi içerisinde yer almaktadır.¹⁶⁴

TLR4 geninin 4. ekzonunda, +896. pozisyonda, fonksiyonel bir polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizm, A>G geçişi ile *TLR4* reseptörün ekstrasellüler domaininde değişimlere yol açmaktadır. Bazı çalışmalar *TLR4* reseptörüne doğru sinyalizasyonun defektli olmasının şiddetli doku yıkımı ile beraber fazlasıyla artmış inflamatuvar cevap olmasına neden olduğunu bildirmiştir. Son olarak, Hold ve arkadaşları *TLR4*+896A>G polimorfizminin *H.pylori* ile enfekte bireylerde fazlasıyla artmış ve doku yıkımı ile karakterize kronik inflamatuvar cevaba yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Nitekim daha sonra yapılan çalışmalarda *TLR*+896G taşıyıcılarında anlamlı derecede daha şiddetli gastrik atrofi ve inflamasyon gösterilmiştir.¹⁶⁵ Bu polimorfizme sahip bireylerde şiddetli inflamasyon ve buna bağlı olarakda prekanseröz anomaliler için en önemli risk faktörü olan hipoklorhidri ve gastrik atrofi gelişme riskinde artış söz konusudur. Ortaya çıkan şiddetli inflamasyon, *H.pylori* enfeksiyonu ile başlamakta, aklorhidrik mideye çok çeşitli bakterilerin kolaylıkla kolonize olması ile artmakta ve karsinojenik proses tetiklenmektedir.¹⁶⁶ Nitekim, *H.pylori* ve *H.pylori* dışı bakterilerinin simültane varlığında atrofik gastrit riskinde ve IL-1 β ile IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin sirkülasyonda seviyelerindeki yükselme kaydedilmektedir.¹⁶⁷

IL-1B, TNF- α , IL-10, IL-8, *TLR4*, mannoz bağlayan lektin gibi adaptif ve doğal immün sistem cevabında her hangi bir anomali olmayan, proinflamatuvar genetik profili sağlıklı bireylerin, *H.pylori* enfeksiyonuna, kronik inflamasyon ve düşük asiditeye sahip

bir mide ortamı oluşturarak cevap verdiği düşünülmektedir. Bu ortam, gastrik ortamda inflamasyonu ve oksidatif/genotoksik stres oluşumunu artırmakta ve diğer bakterilerin gelişmesine yardımcı olmaktadır. Aynı proinflamatuvar polimorfizme sahip bireyler *H.pylori* dışı bakterilere aynı şekilde abartılı olarak cevap vermekte, böylece neoplastik değişimler artarak sürmektedir. Bu olguda, gastrik karsinogenezisin son safhalarında neden *H.pylori*'ye gerek duyulmadığı ve neden gastrik tümör dokularında çoğu kez *H.pylori* bulunmadığını da açıklamaktadır.

2.10. Yaptığı Hastalıklar

H.pylori'nin sebep olduğu klinik patolojileri gastrointestinal sistem hastalıkları gastrointestinal sistem dışı hastalıklar olarak iki ana başlığa ayırmak mümkündür.

2.10.1. Gastrointestinal sistem hastalıkları

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 patolojilerden sorumlu bulunmuştur.³³ Ayrıca, fundusdaki lokalizasyonları ile mide-özefagus reflü ve üst gastrointestinal sistem karsinomaları ile de ilişkisi gösterilmiştir.¹⁸⁵

2.10.1.1. Gastroözefajial Reflü Hastalığı (GÖRH)

H.pylori enfeksiyonu ve gastroözefajial reflü hastalığı (GÖRH) arasındaki ilişkiyi inceleyen retrospektif ve prospektif birçok araştırma yayınlanmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında *H.pylori* enfeksiyonunun GÖRH'e karşı koruyucu bir rolü olmadığı gösterilirken¹⁸⁶, bir kısmında da bu organizmaya bağlı enfeksiyonun reflü hastalığını ortaya çıkarabileceği veya daha önce var olan reflü hastalığını alevlendirebileceği vurgulanmıştır.¹⁸⁷ Batı toplumunda *H.pylori* enfeksiyonu sıklığındaki azalmayla birlikte GÖRH insidansının artması, *H.pylori* enfeksiyonunu GÖRH gelişimine karşı koruyucu rol oynayabileceği şeklinde bir düşüncenin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Sonuç olarak

bugün için genelde kabul gören bir görüş GÖRH'ün şiddeti ile *H.pylori* varlığı arasında tersine bir ilişki olduğu şeklindedir.

2.10.1.2. Gastrit

En çok görülen *H.pylori* enfeksiyon kliniği kronik gastrit şeklindedir ve enfeksiyon sıklıkla asemptomatik süperfisial gastrit şeklinde sonuçlanmaktadır. Gastrik mukozada görülen inflamatuvar patolojileri içine alan gastrit için, günümüze kadar çok çeşitli sınıflandırmalar kullanılmıştır. Bu sınıflandırmalar arasında eroziv, non-eroziv ve spesifik histopatolojik değişikliklerin olduğu a) yüzeysel b) diffüz c) panmukozal, atrofik gastrit gibi bir sınıflandırma, veya morfolojik ve topografik özelliklere göre a) tip A, b) tip B gibi bir sınıflandırma veya 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. *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 otoimmun cevabı başlatarak indirekt yollarla gastrik mukozada hasara yol açmaktadır³.

H.pylori'nin gastrik mukozada dağılımı homojen olmayıp genellikle yamalı bohça tarzın da 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 inflamasyonu karakterize eden hücreler ile infiltre olduğu gözlenmektedir.¹⁸⁸

2.10.1.3. Mide Ülseri (MÜ)

H.pylori, MÜ'li hastaların $\geq$ % 70'inde gastrik mukozada pozitif bulunmuştur. Mide ülserlerinin geri kalan % 25'inde non-steroidal antiinflamatuvar ilaç kullanımı, % 3'ünde Zollinger-Ellison sendromu, % 2 vakada çeşitli faktörler suçlanmıştır.

Enfeksiyonun kaldırıldığı olgularda ülser nüksü oranında belirgin bir azalma görülmüştür.¹⁸⁸

2.10.1.4. Duodenal Ülser (DÜ, peptik ülser)

H.pylori ile enfekte bir kişide yaşam boyu peptik ülser gelişme riski ABD’de % 3, Japonya’da % 25 olarak bildirilmiştir.²³⁴ 3-10 yıl boyunca süren progressif vaka kontrol çalışmaları ile *H.pylori* ile enfekte kişilerde duodenal veya gastrik ülser gelişme riski 4 ila 13 kat artmaktadır. İstatistiki risk verilerine rağmen *H.pylori* ile peptik ülser arasındaki ilişkiye ait en güçlü delil eradikasyon tedavisi sonrası rekürrens oranlarındaki anlamlı düşüştür. *H.pylori* eradikasyonu ile gastrin homeostazindeki değişikliklerin normale döndüğü bilinmektedir. *H.pylori* eradikasyonundan sonra, antral somatostatin konsantrasyonu ve antral D hücre yoğunluğu anlamlı ölçüde artar, antral gastrin seviyeleri azalır. Duodenal ülseri olan hastaların % 95’inden fazlasında *H.pylori* gastriti mevcutken *H.pylori* negatif hastalarda DÜ hastalığı son derece nadirdir. Yüksek asit yüküne sahip hastalarda diffüz antral gastrit ve duodenal ülser gelişme sıklığı artmıştır. Düşük asit yüküne sahip hastalarda ise korpus gastriti ve multifokal atrofi ve bunların yatkınlık oluşturduğu gastrik ülser gelişmesi daha sık olmaktadır. Duodenal mukoza ve muskularis mukozayı içine alan lokalize doku kaybı olan ülser, sık nüks görülen kronik bir hastalıktır. Etiyopatogenezinde; parietal hücre kitlesinde artış, bazal asit sekresyonunda artış, postprandiyal asit ve gastrin sekresyonunda artış, asit ve gastrin sekresyonunun inhibisyonundaki azalma, hızlı mide boşalması, duodenal asit yükünde artış, mukozal direncin azalması, genetik özellikler, diyet, *H.pylori*, sigara, NSAİİ, stres, safra sekresyonundaki düzensizlikler ve lisesitinin düzeyi gibi kişisel ve ailediki nüfus, içme suyu özellikleri gibi çevresel faktörler etkili bulunmuştur.

2.10.1.5. Nonülser Dispepsi (NÜD)

NÜD’de klinikten sorumlu tutulacak organik sebepler yoktur. Bu hastalarda *H.pylori* prevalansı anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Semptomların nedeni ve mekanizması açık değildir fakat yakınmaların psikososyal faktörler, gastrointestinal hipersensitive, gastrik asit hipersekresyonu, *H.pylori* enfeksiyonu ve gastroduodenal

dismotilite sonucu geliştiği düşünülmektedir. Düşük *H.pylori* prevalanslı gelişmiş ülkelerdeki NÜD'li hastalar ve çocuklarda *H.pylori* prevalansı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur.

2.10.1.6. Mide Kanseri ve MALT (Mucosa Associated Lenfoid Tissue)

Lenfoma

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.¹⁸⁹ Prospektif çalışmalarla *H.pylori* kronik gastritinin, intestinal metaplazi ve atrofik gastrite doğru ilerlediği gözlenmiştir¹⁹⁰ ve bu tür patolojik lezyonlar gastrik karsinomanın öncülü olarak kabul edilmektedir. Düşük asit yükü ve kronik *H.pylori* enfeksiyonu olan kişilerde intestinal metaplazi ve displazi görülme sıklığı artmaktadır. *H.pylori* enfeksiyonu gastrik MALT lenfoma riskini anlamlı derecede artırmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar MALT lenfomalı hastaların % 98'inin *H.pylori* ile enfekte olduğunu göstermiştir.¹⁸⁹ Diğer taraftan düşük grade MALT lenfomalı hastalarda başarılı bir *H.pylori* eradikasyon programı ile hastaların % 82'sinde tümörde gerileme sağlamaktadır.¹⁹¹

2.10.2. Gastrointestinal sistem dışı hastalıklar

Son yıllarda *H.pylori* ile kardiyovasküler sistem, solunum yolları, merkezi sinir sistemi, deri yumuşak doku ve otoimmün hastalıklar arasında ilişki olduğunu ima eden çok sayıda çalışmaya ait sonuç yayınlanmıştır.¹⁹² Bakterinin bu hastalıklardaki rolü kesinlik kazanmamakla birlikte elde edilen sonuçlar klinisyenlerin eradikasyon tedavilerine ilgisini artırmıştır.¹⁹³ Bu bağlamda; iskemik kalp hastalarında yüksek oranlarda *H.pylori* enfeksiyon prevalansı bildirilmiş, Behçet, Sjögren sendromu gibi bazı otoimmün hastalıklarla *H.pylori* arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, karaciğer ve safra yolu hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ürtiker, akne rozasea gibi deri hastalıklar, ITP, demir eksikliği anemisi, megaloblastik anemi gibi hematolojik

hastalıklarla ve romatoid hastalıklar arasında da muhtemel bir ilişkinin varlığından söz edilmiştir.¹⁹⁴ Ancak elde edilen veriler, bu hastalıklarla *H.pylori* nfeksiyonu arasında kesin bir ilişki olduğunu söylemek için yeterli olmayıp, geniş kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

2.11. *Helicobacter* Enfeksiyonlarında Tanı

H.pylori ile ilişkili gastroduodenal hastalıkların tanısı, klinik ve laboratuvar bulgulara dayanmaktadır. Enfeksiyonunun tanısına yardımcı olabilecek birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Bu testler, direkt yani invazif testler ve indirekt testler yani non-invaziv testler olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. *H.pylori*'nin tespitinde altın standart araştırmacının deneyimine göre kültür veya histopatolojik inceleme olarak tanımlanabilir. Tanıyı optimize etmek için genellikle birkaç testin birlikte kullanılması önerilmektedir. Kullanılacak olan testin seçimi, yöntemin uygulanabilirliği, testin sensitivite ve spesivitesi, ulaşım imkanları, maliyeti ve hasta tarafından tolere edilebilirliği ve hastanın klinik yakınmaları ve fizik bulgular dikkate alınarak yapılır. Aşağıda (Tablo 7) çeşitli tanı testlerin genel özellikleri tanımlanmıştır.

2.11.1. Klinik tanı ve endoskopi

Fleksible endoskopik cihazların geliştirilmesi ile yöntemin hasta tarafından tolere edilebilmesi kolaylaşmış ve maliyet ucuzlamıştır. Zaman alıcı olması nedeni ile endemik bölgelerde alarm semptomu olmayan hastalarda önerilmeyen endoskobik muayene ve invaziv testlerin son derece önemli avantajları bulunmaktadır. Endoskobik muayene sırasında mukozanın görünüşü, gastritin formu, lezyonun lokalizasyonu ve hangi laboratuvar tanı yönteminin kullanılması gerektiği gibi prognozu etkileyecek önemli bulgular elde edilebilmektedir. Antrumdaki lezyon daha çok duodenal ülserle işaret ederken, korpusdaki lezyon atrofik gastrit, gastrik ülser ve gastrik karsinomalar için önemli bir bulgudur. Ek olarak fokal, granümatöz veya lenfositik gastrit endoskobik bakı ile tespit edilebilmektedir.

Tablo 7. *H.pylori* enfeksiyonu tanısında kullanılan testlerin genel özellikleri.

Test	Sensitivite (%)	Spesivite(%)	Maliyet	Endoskopi	Yorum
Histoloji	90-95	95-99	++	Evet	Bakterinin düzensiz dağılımı nedeniyle çoklu biyopsi erektirir. İnflamasyonun derecesi belirlenebilir.
Kültür	75-90	100	+++	Evet	Laboratuvarın deneyimine göre değişkenlik gösterir. Antibiyogram için ereklidir.
Hızlı Üre Testi	85-95	90-95	+	Evet	Hızlı sonuç. Antibiyotik tedavisinden sonra sensitivite düşer.
G. Biyopsi PCR	95	100	+++	Evet	İleri düzey laboratuvarlarda
¹³C nefes testi	95	98-100	++	Hayır	Hamileler ve çocuklarda tercih edilebilir. Tedavinin erken dönem takibinde kullanışlıdır.
¹⁴C nefes testi	95	90-100	++	Hayır	Düşük doz radyasyon maruziyeti. Tedavinin erken dönem takibinde kullanışlıdır.
Seroloji	80-95	85-95	+	Hayır	Endoskopi öncesi taramada ve epidemiyolojik kullanışlıdır. Tedavinin erken dönem takibinde önerilmez.
Dışkıda antijen Tespiti	94	97	++	Hayır	Pediyatrik hastalarda kullanışlı. Tedavi öncesi ve sonrası aktif enfeksiyonu tespit etmeye uygun.

G. Biyopsi: Gastrik doku biyopsi

2.11.2. Mikrobiyolojik tanı

Tanıda kullanılan yöntemlere göre kullanılan testleri non-invaziv testler ve invaziv testler olarak iki gruba ayırmak mümkündür.

2.11.2.1. Non-İnvaziv Testler

Bu grup testler arasında serolojik testler, idrar ve tükürükte antikor arayan testler, üre nefes testi, dışkıda antijen arayan testler, moleküler bazlı testler, String test, ve hasta başı tam kan kullanılarak yapılan testler yer almaktadır.

2.11.2.1.1. Serolojik Testler

H.pylori enfeksiyonu, serumda spesifik IgG, IgA, sektratuvar IgA ve düşük düzeyde IgM cevabı ile karakterize sistemik ve lokal immün cevaba yol açar. Hücre sonikatları, asit-glisin ekstraktları, ısı-stabil antijenler, cagA antijenleri ve üreaz benzeri saflaştırılmış proteinler gibi çok çeşitli antijenler *H.pylori* spesifik antikorların tespiti için kullanılmıştır. Saflaştırılmış antijen preparasyonları genellikle tam hücre ve sonike edilmiş ekstraktlardan daha sensitif ve spesifiktir. Ticari olarak geliştirilen serolojik testler genellikle ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) bazlı testlerdir. *H.pylori* spesifik üreaz testleriyle kıyaslandığında serum ELISA testlerinin sensitivite ve spesivitesi % 85 ve 79 civarında değişmektedir.¹⁹⁵ Ancak, antibiyotik ve/veya bizmut tuzları veya proton pompa inhibitörlerinin kullanımına bağlı olarak infekte şahısların % 20-30'unda yalancı negatiflik görülebilir. Tedavi edilmiş kişilerde serum IgG düzeylerinin yıllar boyu devam etmesi nedeniyle IgG düzeylerinin belirlenmesi epidemiyolojik çalışmalarda ve endoskopi öncesi dispeptik hastaların taranmasında oldukça kullanışlı bir yöntemdir.¹⁹⁶ Başarılı bir bakteriyel eradikasyondan sonra antikor titreleri altı ay içerisinde % 50 oranında azalma eğilimi göstermektedir.¹⁹⁷ Bununla birlikte başarılı bir tedaviden sonra kişiden kişiye değişebilen geniş varyasyonlar vardır ve bazı kişilerde eradikasyondan sonra düşük düzey IgG seviyeleri yıllar boyu kalmaya devam eder. Serolojik testlerin tanısal doğruluğu düşüktür ve sadece *H.pylori* tarama testi olarak kullanılmaları önerilmektedir. Serolojik testlerin antimikrobiyal tedavilerin kısa dönem takibinde oldukça sınırlı değerleri vardır. Bu tür durumlarda üre nefes testleri daha uygun testler.

2.11.2.1.1.1 Tam Kan kullanılarak Yapılan Hasta Başı Testler

Tam kan kullanılarak yapılan hızlı ve uygulaması kolay testler geliştirilmiştir fakat sensitivite ve spesivite oldukça değişkendir. Ticari olarak kullanıma sunulan hasta başı testlerde serum veya parmaktan alınan kan ile çalışılmaktadır. Flexsure *H.pylori* ve Quickview One Step bu amaçla tasarlanmış testlerdir. On dakika gibi kısa sürede sonuç vermelerine karşılık pahalı oluşları ve gıda ve ilaç yönetmeliğinden (FDA) onay almış olmalarına rağmen henüz spesifikite ve sensitivite hakkında yeteri kadar bilgi ve tecrübe oluşmayan bu testlerin yaygın kullanımı

önerilmemektedir. Hata oranları nedeniyle genel pratikte tanı amaçlı olarak kullanılmaktadırlar.

2.11.2.1.1.2 Tükürük ve İdrar antikor Testleri

İdrar ve tükürükte anti-*H.pylori* IgG antikorlarını tespit eden ticari testler non-invazif olmaları ve kolay uygulanmaları nedeniyle ilgi çekmektedirler. Fakat tükürük testleriyle yapılan birçok deneme çalışmasında doğruluk oranlarının kabul edilemeyecek kadar az (sensitivitesi % 81, spesivitesi % 73) olduğu gösterilmiştir.

Japonya ve Avrupa’da yapılan idrar ELISA testlerinde, serum ELISA testleriyle kıyaslanabilir bulgular elde edilmiştir.¹⁹⁸ Japon popülasyonunda çocuk yaş grubunda yapılan başka bir çalışmada ise çocuklar 12 ay arayla idrarda *H. pylori* IgG antikoru yönünden taranmış, elde edilen sonuçların idrar testinin tanı değerinin yüksek olduğunu gösterdiği bildirilmiştir.²⁵⁷

2.11.2.1.2. String Test

String test (Enetero Test) gastrik sıvıdan direkt örnek almada minimal invazif test olmasıyla endoskopiye alternatif bir testtir fakat pratikte kullanımıyla ilgili fazla bilgi birikimi yoktur. Gastrik sıvının örneklenmesi gastrik mukozadan dökülen enfeksiyon etkeni suşların belirlenmesinde iyi bir yöntemdir ve aynı zamanda kültür ve PCR ile analizine imkan vermektedir.

2.11.2.1.3. Üre Nefes Testi

Üre nefes testi, hem tedavi öncesinde hem de sonrasında yüksek duyarlılığa sahip standardizasyonu yapılmış non-invaziv bir testtir. Oral olarak verilen karbon izotopuyla işaretlenen ürenin midede *H.pylori* varlığında hidrolizi prensibine dayanmaktadır. Hidroliz sonucu amonyak ve bikarbonat oluşur ve oluşan karbondioksit akciğerler yoluyla dışarı atılır. Nefesteki işaretli karbondioksit miktarı üreaz aktivitesini yansıtmaktadır ve aktif enfeksiyonun bir belirteci olarak kullanılmaktadır. İzotop olarak işaretli 2 tip üre geliştirilmiştir ¹³C ve ¹⁴C. Her iki test de non-invazif olması ve aktif

enfeksiyonu belirleyebilmesi, primer tanı ve tedaviye cevabı izlemeleriyle çeşitli avantajlar sağlamaktadır.¹⁹⁹

¹³C üre nefes testi yaygın olarak kullanılmasına rağmen non-radyoaktif ¹³C miktarını ölçmede kütle spektrofotometresini gerektirmesi nedeniyle daha pahalıdır. Diğer taraftan ¹⁴C üre nefes testinin uygulanması ¹³C testinden daha basittir. ¹⁴C testi ise daha ucuzdur fakat çok düşük dozda da olsa uzun ömürlü radyoizotoplara maruziyet vardır. Bu nedenle çocuk ve hamile hastalarda ¹³C üre nefes testi tercih edilmelidir. Testin duyarlılığı % 90-100, özgüllüğü % 86-100 arasında değişmektedir.²⁰⁰ ¹³C üre nefes testi hastanın yaşından bağımsız olarak oldukça yüksek sensitiviteye sahiptir fakat spesivite yeni doğan ve küçük çocuklarda düşmektedir. Her iki testin de bir ay antibiyotik tedavisi sonrası tedavinin başarısını değerlendirmede oldukça güvenlidir. Önceden antibiyotik, bizmut tuzları veya PPI tedavisi alan hastalarda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle test öncesinde ilaç alımı sınırlandırılmalıdır.

2.11.2.1.4. Dışkıda Antijen Arayan Testler

Son zamanlarda geliştirilmiş dışkı antijen testleri, *H.pylori* spesifik antijenlerin dışkıda tespitine dayalı immünolojik testlerdir. Dışkı örneklerinde *H.pylori* spesifik antijenleri tespit eden ELISA temelli test kitleri non-invazif olması, özel ekipman gerektirmemesi ve serolojiden farklı olarak aktif enfeksiyonu da göstermesiyle büyük ilgi görmüştür. Bununla birlikte pediatrik hasta grubunda seroloji ve invazif yöntemlerden daha uygundur. Yapılan birçok çalışma ile dışkı antijen testlerinin primer enfeksiyonu belirleme ve eradikasyon sonrası takipte kullanımı incelenmiştir. Tedavi edilmemiş 4769 hastayı kapsayan 43 çalışmanın özetlendiği bir çalışmada *H.pylori* Stool Antigen'in (HpSA) yüksek sensitivitede (% 92,4) ve spesivitede (% 91,9) olduğu gösterilmiştir.²⁰¹ Pediatrik popülasyonda primer enfeksiyon tanısında IDEIA-HpStAR (Dayko) kitinin daha sensitif (% 98) olduğu ve bu kitin çocuklarda tedavi sonrası eradikasyonu takip etmede daha spesifik olduğu bulunmuştur. Dispeptik 148 erişkin hasta üzerinde yapılmış başka bir çalışmada eradikasyon tedavisinin izlenmesinde IDEIA HpStA kitinin (% 88,6) HpSA kitinden (% 80) daha duyarlı olduğu gösterilmiştir.²⁰² Tüm bu özellikler dışkı testlerinin erişkinlerde ve pediatrik hastalarda, hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrasında daha sensitif ve spesifik olduğunu

göstermiştir.^{202,203} Gaitada *H.pylori* antijenlerini tespitiye yönelik testler, non-invaziv testler arasında yer alan üre nefes testine en iyi alternatif olarak görölmektedir.

2.11.2.1.5. Dışkıda Moleküler Bazlı Testler

Gaitada *H.pylori* spesifik genomunun moleküler yöntemlerle (PCR-Polimeraz zincir reaksiyonu) gösterilmesi non- invazif olması ve yüksek duyarlılıkta ve özgülükte olması nedeniyle giderek artan bir ilgiye sahiptir. Fakat özel laboratuvar ekipmanı ve deneyimli personel gerektirmesi, kısmen maliyeti yüksek olması nedeniyle rutin tanıda kullanılmamaktadır. Seçilecek DNA ekstraksiyon yöntemi bu testlerin duyarlılığında belirleyici noktadır. DNA ekstraksiyonunda inhibitörlerin uzaklaştırılması gerekmektedir ve doğru yöntem seçilmemesi yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Standardize edilmiş ticari dışkı DNA izolasyon kitlerinin kullanılması önerilmektedir. Yine, moleküler testlerde metodun duyarlılığını ve özgülüğünü belirleyen en önemli parametrelerden birisi metotta kullanılan seçilmiş primer çiftleridir. *H.pylori*'nin PCR ile tespitinde *ureA*, *glmM*, *16S rRNA*, *23S rRNA* ve *Hsp65* genlerini hedef alan çeşitli primerlerin kullanıldığı moleküler yöntemler uygulanmaktadır.

2.11.2.2. İnvaziv Testler

Testin yapılabilmesi için endoskopik mide biyopsi örneğine gereksinim duyan histopatolojik inceleme, hızlı üreaz testi, kültür, moleküler temelli testler bu grupta toplanmıştır.

2.11.2.2.1. Histopatolojik inceleme

H.pylori'nin özgün morfolojisi ışık mikroskobu ile başarılı bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Çoğu araştırmacı histopatolojik incelemenin *H.pylori* enfeksiyonunun tanısında altın standart olduğunu kabul etmektedir.^{204,205} Birçok olguda organizma sayısının düşük olduğu durumlar dışında enfeksiyon Hematoksilen- Eozin boyama ile yüksek oranda tespit edilebilmektedir. Organizma en iyi lüminal bölgede musin yakınında veya içinde görülebilmektedir. Modifiye Giemsa ve Warthin-Starry gümüş

boyası daha fazla sensitiviteye sahiptir. Warthin-Starry gümüş boyası ilk olarak 1983 yılında Warren tarafından kullanılmış olup oldukça iyi sonuç vermekle beraber yoğun laboratuvar işi isteyen pahalı ve deneyimli teknisyenlere ihtiyaç duyulan bir boyama yöntemidir. Modifiye Giemsa boyası ise daha basittir ve daha az laboratuvar işi gerektirir. *H.pylori* için önerilen diğer boyalar: Akridin oranj (floresan boya), Cresil-fast Moru, Gimenez ve Brown-Hopps moru boyalarıdır. Zedelenmiş dokunun faz kontrast mikroskopisi hızlı ve uygun bir yöntemdir. Mukus sürüntülerinin veya biyopsi örneklerinin Gram boyaması da kullanılabilse de diğer boyalara göre daha az sensitiviteye sahiptir. Çoklu gastrik biyopsi temin edildiğinde histolojinin sensitivite ve spesivitesi % 95'in üzerindedir. Histolojinin bir başka avantajı da inflamasyon derecesini ve diğer ilişkili patolojilerin tespitine izin vermesidir. Yeni fakat yaygın olarak kullanılmayan bir başka test ise Floresan Insitu hibridizasyon (FISH) testidir.²⁰⁶ Bu testle bakterinin varlığının yanı sıra antimikrobiyal direnç genlerinin varlığı da araştırılabilmektedir.

H.pylori tarafından midenin kolonizasyonu değişmez bir şekilde kronik aktif gastrit veya antral tip-B gastriti ile ilişkilidir.²⁰⁷ Bu patern genellikle epitelyumun yüzeysel polimorfonükleer lokosit inflamasyonu ile karakterizedir.²⁰⁸ İnflamasyonun derecesi yüksek orana değişkendir ve lamina proprianın minimal inflamatuvar infiltrasyonundan mikroabse formasyonu, reaktif epitel atipisi ve intraepitelyal nötrofillerle karakterize yoğun inflamasyon gibi ağır olabilir. Genellikle *H.pylori* sayısı ile polimorf infiltrasyonun derecesi arasında bir korelasyon vardır. Histolojisi normal biyopsi örneklerinin yaklaşık % 5'inden azında bakteri bulunmaktadır ve bulunduklarında da genellikle mide gövdesine yerleşmektedirler. Bakterinin midede yerleşiminin uniform olmaması nedeniyle nötrofil aktivitesi görülen bazı kronik yüzeysel gastrit olgularında, örnekleme hatası nedeniyle *H.pylori* varlığı gösterilememektedir.²⁰⁹ Eğer enfeksiyon tedavi edilmeden bırakılırsa spontan iyileşme olmamakta ve sıklıkla enfeksiyon ömür boyu devam etmekteir. Hayatın ilerleyen yıllarında inflamatuvar proses mukozanın derinlerine doğru ilerlemekte, antrumun pilorik glandlarında ve endokrin hücrelerinde kısmı kayıplar gelişmekte (atrofi), ve mukozanın intestinal metaplaziye doğru değiştiği gözlenmektedir.²¹⁰

2.11.2.2.2. Kültürde  zolasyon

Enfeksiyon tanısında en spesifik yöntem ve altın standart direkt gastrik biyopsiden yapılan *H.pylori* kültürüdür.^{204,205} Fakat sensitivitesi hem biyopsinin transport şartlarına hem de laboratuardaki uzman durumuna göre değişmektedir. Bununla birlikte *H.pylori*  zel kültür ortamına ihtiyaç duyan yavaş ve zor üreyen bir mikroorganizmadır. Bu yüzden sadece kültür sonuçlarına güvenmek bazı enfekte olguların gözden kaçmasına yol a abilir. Örneğin yanlış kültür teknikleri, kültürde kontaminant bakterilerin üremesiyle *H.pylori* kolonilerinin baskılaması veya mide biyopsi örneğin düşük bakteri yüküne sahip bölgelerden alınmış olması gibi durumlar yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Pahalı bir yöntem olmasına rağmen bakterinin kültürde üretilmesiyle kesin tanının konmasının yanısıra, üretilen bakterinin antibiyotiklere karşı invitro duyarlılığı, moleküler tiplendirme yöntemleri ile virulans faktörleri araştırılabilir ve reinfeksiyon, relaps veya mikst infeksiyon ayrımı yapılabilir. Biyopsinin transport şartlarına azami önem göstermek kültürün başarısını artırmaktadır. Alınan biyopsi materyali soğuk zincirde taşınmalı ve 4-6 saat içerisinde kültürü yapılmalıdır. Laboratuarda hazırlanan beyin kalp infuzyon 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 kullanılmıştır.²¹¹

Ticari olarak elde edilen selektif besiyerleri, nazofaringeal ve diğer potansiyel kontaminantları baskılayabilmektedir fakat bu besiyeri ile birlikte % 10 taze at kanı içeren Colombiya agara da ekim yapılması önerilmektedir. Kültür, selektif ve non-selektif besiyerleri kullanılarak mikroaerofilik atmosferde, 37 C’de, 5-7 gün inkübasyonla gerçekleştirilir. Koloniler 3-5 gün inkübasyon sonrası gözle görülebilir boyuta ulaşabilir fakat primer izolasyonunda bu süre biraz daha uzayabilir. Koloniler küçük, şeffaf, hafi bombelidir ve bazen zayıf hemolitik aktivite gözlenebilir. Kültürün duyarlılığı uzman ellerde dahi % 75-90 arasında değişmektedir.  dentifikasyon için Gram boyama, katalaz, oksidaz ve üreaz testi gibi birkaç basit test yeterli olmaktadır. Kültürün gastrik biyopsi gerektirmesi, 7 gün kadar uzun sürmesi, özel laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç duyulması ve maliyeti artırması gibi dezavantajları da vardır.  zelleşmiş laboratuarlarda sensitivite % 90’ı aşabilir fakat bu oran eğer hasta önceden antibiyotik veya proton pompa inhibitörü almışsa flora elemanlarının kontaminasyonu

olabilmekte veya üreme inhibe olabilmektedir. Kültürün sağladığı en önemli avantajlardan biri de günümüzde giderek artan bir sorun olan antibiyotik direncini belirlemeye olanak sağlamasıdır. *H.cinaedi*, *H.fennelliae*, *H.pullorum* gibi intestinal *Helicobacter*'ler *Campylobacter* selektif besiyerlerinde izole edilebilmektedirler.²¹²

2.11.2.2.3. Hızlı Üre Testi

Enfekte gastrik mukoza fenol kırmızısı içeren bir üre solüsyonuna koyulduğunda *H.pylori* indikatörün rengini değiştirecek düzeyde yoğun üreaz enzimine sahiptir. Ürenin parçalanması ile oluşan amonyak ortamın pH'sını artırmakta ve indikatörde renk değişikliği olmaktadır. İlk testlerde Christensens Broth testi kullanılmış fakat sonra sıvı ortam yerine jellerin kullanılması ile daha hızlı sonuç alındığı görülmüştür. Bu testle ilgili çok çeşitli modifikasyonlar tanımlanmıştır ve yaygın olarak bir ticari test olan CLO testi (*Campylobacter* Like Organism) kullanılmaktadır. Bir saat içerisinde pozitiflik veren olgularda % 100'e ulaşan özgüllüğe ve en az % 80 sensitiviteye sahiptir. Yapılan kantitatif çalışmalarda örnekte en az 10^4 bakteri olması halinde pozitif sonuç alınabilmektedir. Çoklu biyopsi örneklerinin alınması duyarlılığı artırmaktadır.²¹³ Oral kaviteden üreaz üreten bakterilerin kontaminasyonu ile yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. Pratikte üreaz test sonuçlarının 24 saat içerisinde değerlendirilmesi gerekmektedir. Birçok olguda endoskopi sırasında tanının koyulması tedavinin planlanması için daha avantajlı olmaktadır. Kullanılan test kitleri histolojik yöntemler ve kültürden daha ucuzdur.^{214,258}

2.11.2.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

Fenotipik tanı yöntemlerinin zaman alıcı olması, değişen oranlarda sensitivite ve spesivitelere sahip olması nedeniyle son yıllarda moleküler tekniklere eğilim artmıştır. Moleküler tanı yöntemleri, değişik klinik örneklerde *H.pylori* varlığının belirlenmesine ek olarak virulans faktörlerinin tayini, konakta ortaya çıkan farklı kliniklerin genetik temeli ve doku polimorfizmi, antibiyotik direncine neden olan mutasyonların belirlenmesi, eradikasyon tedavisinden sonraki re-enfeksiyonlarının tespit edilmesi ve kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Potansiyel

olarak en yüksek sensitiviteye sahip test *H.pylori* spesifik DNA'nın PCR ile belirlemesidir. Moleküler yöntemlerin başarısı, seçilecek DNA ekstraksiyon yöntemi, hedef gen bölgeleri ve bu bölgeleri tanıyan primerlerin seçimi ve uygulama şartları gibi bir çok değişkenin ortak başarısına bağlıdır.^{248,249} Örneğin, başarısız bir DNA izolasyon yöntemi yanlış negatif sonuçlara yol açabilirken iyi seçilmemiş primer çiftleri beklenmedik sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle primer seçimi testin sensitivite ve spesivitesini direk olarak etkilemektedir. Biyopsi materyalinden mikroorganizmanın direkt tanısında kullanılmak üzere birçok PCR metodu denenmiştir. Bu PCR metotlarında bakteriye ait hedef genler arasında sıklıkla 16S rRNA geni, random kromozom dizileri, 24 kDa tür spesifik protein kodlaya genler ve 26 kDa tip spesifik antijen geni, üreaz A (*ureA*) geni ve önceleri üreaz C (*ureC*) olarak adlandırılan phosphoglucosamine mutaz, *glmM*, geni kullanılmıştır.²¹⁵ Test edilen materyale ve testin tipine göre de sensitivite ve spesivite değişmektedir.²¹⁶ Moleküler tekniklerle mide dokusunun yanı sıra dışkı, tükürük, diş taşları, aterom plaklar, mide sıvısı ve kültür örneklerinde patojen tayini ve genotipik özelliklerinin tespiti yapılabilmektedir. Fakat örnekleme hatası, bakteriyel yükün çok az olması veya inhibitör maddelerin varlığında yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir, bununla beraber moleküler yöntemler canlı-ölü bakteri ayırımını yapamamaktadır. Moleküler testler, standart kitlerden daha kompleks olmalarından ötürü genellikle özelleşmiş laboratuvarlarda kullanılmaktadırlar. Örneğin UNT veya CLO test pozitif fakat kültür negatif olgularda bu tür beklenilmeyen sonuçları açığa kavuşturmada faydalı olabilirler.

H.pylori'nin tespiti ve/veya genotipik analizi için In-house-PCR, realtime-PCR, multipleks PCR, PCR-AFLP, PCR-RFLP, RAPD gibi nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, FISH, DNA dizi analizi ve DNA mikroarray teknikleri kullanılmıştır. Testlerin birbirlerine olan üstünlüğü, sensitivite ve spesivite, seçilen DNA izolasyon yöntemi, kullanılan primerler, örneğin türü (kültürden izolasyon, gaita veya doku) ve sonuçların yorumlanması için kullanılan metottan ve araştırmacının deneyiminden etkilenmektedir.

Örnek Seçimi ve DNA izolasyonu: Gastroduodenal patolojilerde sıklıkla tercih edilen klinik örnek endoskopik biyopsi ile elde edilmiş mide dokusudur. Bununla birlikte biyopsi örneğinin alınmasında güçlükler çekilen peiatrik hasta grubu gibi

gruplarda dışkı örneğinden *H.pylori* DNA'sı izole edilebilmektedir. Mide örneklerinde patojen mikroorganizma uniform yayılmaz ve biyopsi materyalinde *H.pylori* bu nedenle uygun hastalarda örnekleme hatasını en aza indirmek için mide antrum ve korpusundan alınacak 2 adet biyopsi örneği önerilmektedir.

H.pylori mide mukozasında yamalı bohça benzeri dağılım göstermesi, yanlış negatif test sonuçlarına yol açabilmektedir. Antrum ve korpustan alınan biyopsi örneklerinde, farklı suşlarla kolonizasyon farklı sonuçlar yaratabilir. Hastanın yaşı veya hastalığın süresi de mide biyopsisi bazlı yöntemlerde duyarlılığı düşürür. Çünkü uzun süren enfeksiyona bağlı olarak gelişen atrofik gastrit veya intestinal tip hücre artışı *H.pylori* için duyarlı epitel alanını azaltır. Bu nedenle yaşlı veya kronik enfeksiyonu olan hastalarda örnek iyi seçilmeli ve birden çok alınmalı veya biyopsi yerine gastrik sıvı örnekleri amplifikasyon amacı ile kullanılmalıdır. Biyopsi örneklerinden *H.pylori* nükleik asitlerini elde etmek için genellikle üç yöntem kullanılmaktadır. Bunlar DNA ticari ekstraksiyon kitlerinin kullanımı, Proteinaz-K, fenol kloroform ekstraksiyonu ve kaynatmadır. Çeşitli çalışmalarda bu üç yöntem için farklı değerlendirmeler yapılmıştır. Proteinaz-K, fenol-kloroform yönteminin en kaliteli DNA eldesine imkan veren yöntem olduğu bir çok yayında ileri sürülürken, işlemlerin artması halinde taşınma kontaminasyon riskinin artacağı, proteinaz-K ve fenol tam olarak uzaklaştırılamayacağı için duyarlılığın düşeceği, işlemin ne kadar basit olursa, sonuçta elde edilen DNA'nın o derecede saf olacağını bildiren yayınlar da vardır.²¹⁷ Örneğin doku biyopsi örnekleri çalışılıyorsa inhibitörleri engellemek ve temiz DNA elde etmek için; dokunun mekanik olarak parçalanması, daha sonra ya olduğu gibi veya Chelex-100 gibi bir zayıf katyonik ajan ilave edilerek kaynatılması önerilmektedir. Klinik örneklerde moleküler yöntemlerin duyarlılığını düşürecek muhtemel inhibitörler çok sayı ve miktarda bulunabilir. Bunlardan korunmak için PCR reaksiyon karışımına % 0.5 bovin serum albumin ilave edilmesi ve ekstraksiyonda mümkün olduğu kadar az kimyasal kullanılması önerilmektedir. Dışkı gibi bakteri yoğunluğunun düşük, inhibitör maddelerin yoğunluğunun yüksek olduğu örneklerde DNA ekstraksiyonu esnasında % 0.5 bovin serum albumini kullanımı veya QIAmp Stool Mini Kit (Qiagen, Milan, Italy) gibi standardize edilmiş ekstraksiyon kitlerinin kullanımı önerilmektedir.²¹⁴ Ayrıca, örnekteki bakteriyi yoğunlaştırmak için *H.pylori* kaplanmış manyetik partiküllerin kullanılmasının duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir.²¹⁸

Hedef Bölge ve Primerlerin Seçimi: Hedef bölgeler çalışma amacına göre belirlenmelidir. Örneğin 16S rRNA diğer helikobakterlerde ve bazı gram negatif bakterilerde ortak dizilere sahip olduğu için bu bölgeleri hedef alan primerlerle yüksek duyarlılıkta ancak düşük özgüllükte sonuçlar alınmaktadır. Bu bölge hedef alındığında, amplikonlar uygun bir restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra ortaya çıkan band profiline göre (PCR-RFLP) *H.pylori* veya diğer helikobakterlerin tanısı konulabilir. Oysa ureC ve ureA genleri *H.pylori* için son derece spesifik olup, NAAT direkt tanı için kullanılacaksa bu genlere ait spesifik dizilerin hedef olarak alınması tanıyı yüksek özgüllük kazandıracaktır. Mide biyopsi örneklerinde patogeneze ilişkili olduğu için çalışmalarda öncelikli hedef olan *vacA* ve *cagA* gibi genlerin aynı allellerinin amplifikasyonu için kullanılan farklı primerlerin farklı duyarlılıkta sonuçlar ürettiği gösterilmiştir.²¹⁹

Dışkıda *H.pylori* tanısında NAAT kullanılacaksa, hedef gende mümkün olan en kısa fragmenti tanıyan primerlerin seçilmesi önerilmiştir. Diş taşlarında *H.pylori* tespiti için dizayn edilmiş PCR çalışmalarında % 0-97 arasında prevalans bildirilmiştir. Bu büyük fark toplumsal hijyen veya kültür farkından çok PCR protokollerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır.^{220,221}

H.pylori PCR tekniklerinde amplifikasyon tekniklerindeki genel problemlere karşı duyarlı olunmalı, yalancı negatiflik veya pozitifliğe karşı üniversal tedbirler alınmalıdır. Yalancı negatif sonuçların belirlenmesi için mutlaka internal kontroller kullanılmalıdır. Özellikle ekstraksiyon aşaması birden fazla olan protokollerde kros kontaminasyonlar her zaman risk olarak kabul edilmeli ve bunun için dTTP yerine dUTP kullanılmalıdır. Ayrıca primer-dimer oluşumunu engellemek için de “hot-start” yöntemi seçilebilecek bir diğer yöntemdir.²²¹ Tedavi öncesi endoskopik biyopsiden histolojik inceleme ve kültür, tedavi takibinde ise üre solunum testi daha yararlıdır.²²²

2.11.2.2.4.1. Amplifikasyon Bazlı Yöntemler;

Amplifikasyon yöntemleri ile *H.pylori*'nin 16S rRNA geni, *cagA*, *vacA* ve allelleri, *cagE* ve alleli, *iceA* ve allelleri, *babA* ve *babB*, *ureA*, *ureB* ve *glmM* (*ureC*) geni, RNA polimeraz altünitlerini kodlayan *rpoB* ve *rpoD* genleri ve HP0638 gibi özgül ve virulansla ilgili olduğu düşünülen genlerin varlığı araştırılmıştır. Çalışmalarda çeşitli

PCR modifikasyonları denenmiştir. Bu tekniklerin tamamı kültür ve histolojik inceleme başta olmak üzere kıyaslandıkları diğer yöntemlere göre daha yüksek özgüllük (% 98-100) ve duyarlılık (10-100 cfu bakteri/0.1 pg DNA) ile yüksek pozitif ve negatif prediktif değerlerine sahip, hızlı ve güvenilir testler olarak yorumlanmıştır.²²² Ancak bu yöntemler, sonuçları etkileyecek olan örnek seçimi, taşıma şekli, DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler, amplifikasyon için seçilen gen bölgeleri ile primer dizilerinin tam olarak standardize edilememiş olması sebebi ile rutin tanıdan çok araştırma amaçlı olarak kullanılmıştır. *H.pylori* araştırmalarında kullanılan amplifikasyon bazlı yöntemlerde iki önemli sorun bulunmaktadır. Bunlar; a) örnekleme ve nükleik asit ekstraksiyonu, b) hedef diziler ve seçilen primerlerdir.²¹⁷

2.12. *Helicobacter* Enfeksiyonlarının Tedavisi

2.12.1. Genel Tedavi Yaklaşımları

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.²²³ 1994 yılında "US National Institutes of Health Consensus Conference", "Avrupa Çalışma Grubu" ve "Avrupa Gastroenteroloji Primer Tedavi Birliği" tarafından *H.pylori* ile enfekte tüm ülserli hastaların antimikrobiyallerle tedavisini önermiştir ve bunun oldukça maliyet etkinliği yönünden faydalı olduğu tanımlanmıştır. Bununla birlikte birçok ülkede ulusal tedavi rehberleri hazırlanmamıştır. İlk olarak 1997 yılında Maastricht konsensus raporuyla çeşitli öneriler getirilmiş ve bu öneriler Maastricht 2-2000 konsensus raporuyla yeniden düzenlenmiş ve güncellenmiştir. Bu rehberlerde kimlerin nasıl tedavi edileceği tanımlanmaktadır.²²⁴ Hastaların tedavisi için önerilen anahtar strateji "test et, tedavi et" yaklaşımıdır ve tedavi, alarm sendromu olmayan, NSAII kullanmamış, persistan dispepsisi olan 45 yaş

altı hastalarda önerilmektedir. Bu yaş, bölgesel gastrik kanser görülme yaşına göre değişebilmektedir. Bununla birlikte fonksiyonel dispepsisi olan hastalarda *H.pylori*'nin rolü ve tedavi ile ilgili tartışmalar hala devam etmektedir.

1.Basamak tedavi: *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, 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 arzu edilmektedir. Bu kriterlere dayanarak Maastricht 2-2000 konsensus raporunda antibiyotiklerle beraber PPI ve ranitidin bizmut sitratın kullanıldığı çeşitli kombinasyon tedavileri önerilmiştir. Bu tedavinin potansiyel yan etkileri ise mide bulantısı, ishal ve çeşitli tat anormallikleridir. 1 hafta süren 3'lü tedavide omeprazol benzeri PPI ile düşük doz 2 antibiyotiğin (metrandazol veya amoksisilin + klaritromisin) kullanıldığı eradikasyon tedavilerinde eradikasyon oranı % 90 civarındadır.²²⁵ Fakat bu oran direnç nedeniyle günümüzde daha azdır. Omeprazol, panteprazol ve lanseprazol *H.pylori* eradikasyonunda kullanılan ilk kuşak referans PPI'lardır.²²⁶ Ayrıca ranitidin bizmut sitrat alternatif olarak kullanılabilir. Metranidazol direncinin yüksek oranda görüldüğü bölgelerde amoksisilin alternatif antibiyotik olarak kullanılmalıdır.

2.Basamak tedavi: Şuanki etkin tedavi rejimlerine rağmen hastaların % 10-20 sinde *H.pylori* eradikasyonu başarısız olmakta ve bakteri 4 hafta veya daha uzun bir süre pozitif kalmaktadır. Başarısızlık genellikle bakteriyel direnç veya hastanın tedaviye zayıf uyumu nedeniyle olmaktadır. Birinci kuşak tedavinin başarısız olduğu durumlarda kullanılacak tedavi şekli şu an kesinlik kazanmamıştır fakat Maastricht 2 2-2000 raporunda PPI ve bizmut, metranidazol ve tetrasiklin içeren 4'lü tedavi önerilmektedir. Yine bu tür durumlarda tedavi öncesi bakterinin antibiyotik duyarlılık profilinin tespit edilmesi önerilmektedir. Hem klaritromisin hem de metronidazole direnç varlığı ikincil tedavideki en büyük sorundur. Ranitidin bizmut sitrat içeren 3'lü tedavi ikincil tedavide bir başka alternatiftir. Sonradan ortaya çıkan başarısızlıklar olgu olgu değerlendirilmesi önerilmektedir. İlginç olarak rifabutın temelli yapılan bazı çalışmalarda umut verici

sonuçlara ulaşılmıştır. Probiyotiklerin *H.pylori* tedavisine alternatif olarak kullanıldığı birçok çalışma yapılmış fakat yeterli düzeyde başarılı bulunmamıştır.²²⁷

2.12.2. Antibiyotik Direnci

Gelişmekte olan ülkelerdeki antibiyotik direnci belirgin bir şekilde gelişmiş ülkelerdeki direnç oranından daha yüksektir. Özellikle klaritromisin direnci hızla artmaktadır. *In-vitro* antimikrobiyal direncin belirlenmesinde agar dilüsyon, disk difüzyon ve E-test yöntemlerinin kullanıldığı birçok fenotipik metot kullanılmıştır.²²⁸ MIC tespitinde E-test kullanım kolaylığıyla agar dilüsyona alternatif yöntem olarak görülmektedir. 1999 yılında “NCCLS” tarafından agar dilüsyon metodu için, 2001 yılında “British Society of Antimicrobial Chemotherapy” tarafından E-test uygulamalarına rehber hazırlanmıştır. Disk difüzyon testi için ise uluslararası kabul edilmiş standart test prosedürü henüz yoktur. “PHLS *Helicobacter* Working Group” tarafından E-test ve agar dilüsyon testlerine çeşitli öneriler getirilmiştir.²²⁹

Metranidazol duyarlılık testinde ve nadiren klaritromisin duyarlılık testinde gözlenen uyumsuzluklara besiyeri, kültür yaşı, inokülüm miktarı, anaerobik preinkubasyon, disk içeriği, sınır zon büyüklüğü ve karışık kültürlerin yol açtığı düşünülmektedir. Fenotipik metotlara ek olarak klaritromisin direnciyle ilişkili 23S rRNA gen mutasyonlarını tespit eden RT-PCR ve PCR-RFLP temelli moleküler testler geliştirilmiştir.²³⁰ Ekstrakte mide biyopsi örneklerinden direkt olarak yapılan real-time PCR ile kültüre gerek kalmadan aynı gün içerisinde direnç sonuçları öğrenilebilmektedir. Buna karşın direnç durumu klasik yöntemlerle 7-12 günde ancak sonuçlandırılabilir. Günümüzde metranidazole direnci tam manasıyla açıklayan bir moleküler test yoktur.

2.13. *Helicobacter* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

H.pylori enfeksiyonu dünyanın en yaygın enfeksiyonlarından birisidir. *Helicobacter pylori*’nin bazı primatlarda da varlığı gösterilmiş olmakla birlikte, esas rezervuarı insandır. Enfeksiyonun prevalansı, geçiş yolları ve risk faktörlerine ilişkin

yapılmış pek çok çalışma vardır. Hijyenik koşulların kötü olduğu yerlerde ve bakım evleri, rehabilitasyon merkezleri gibi kalabalık yaşam koşullarında prevalansın yüksek olması fekal-oral yolla bulaştığını düşündürmektedir. Dental plaklardan soyutlanması, tükürükte polimeraz zincir reaksiyonu ile genetik materyalin gösterilmesi oral-oral yolla da bulaşabildiğini düşündürmüştür.⁴ İnsandan insana nadiren de olsa iatrojenik yolla iyi temizlenmemiş endoskoplarla da bulaşabilmektedir. Öpüşme ve cinsel ilişki ile bulaşması muhtemel görünmekle birlikte çalışmalarla kanıtlanmamıştır.⁴ Yaş ve ülkelere göre prevalans değişiklik göstermektedir. Bakterilerin kolonizasyon oranlarının kadın ve erkeklerde benzer olduğu bildirilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon çocukluk çağının erken döneminde edinilmekte ve 10 yaşına %50-60 enfeksiyon oranına, erişkin dönemde ise %90 oranına kadar ulaşabilmektedir.²²⁸ Buna zıt olarak gelişmiş ülkelerde çocukluk çağında çok az enfeksiyon olmaktadır, prevalansda yaşla birlikte kademeli artış (yılda %0,5-1) gözlenmektedir. 20 yaşında bu oran %20-30 ve 50-60 yaşlarında ise %50 civarında olmaktadır. Prevalans aynı zamanda değişik etnik orijinliler arasında da farklılıklara sahiptir. Örneğin ABD’de sağlıklı İspanyol ve siyah popülasyondaki seropozitiflik İspanyol olmayan beyaz popülasyondan yaş, cinsiyet, coğrafi bölge ve eğitim seviyesinden bağımsız olarak birkaç kat daha yüksektir.²³¹ Etnik gruplar arasındaki seroprevalansdaki bu yüksek farklılığın nedeni tam olarak anlaşılmamış fakat çocukluk dönemindeki sosyoekonomik durum, kötü sanitasyon ve enfekte kişilerle yakın temas risk faktörü olarak görülmektedir. Prevalans ile bakterinin alındığı çocukluk dönemindeki sosyo-ekonomik koşullar arasında kesin bir ilişki vardır.²³² Ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde sosyo-ekonomik koşulların yetersizliği ve sağlıklı yaşam koşullarının sağlanamaması nedeniyle 5-10 yaş arasında prevalans %60-70, yetişkinlerde ise bu oran %85-90’dır. Monozigotik ve dizigotik ikizlerde yapılan çalışmalarda enfeksiyona kalıtsal duyarlılığı ve çevresel faktörlerin etkilerini gösterilmiştir. () Cag+ sitotoksik suşların prevalansında da ülkeler arası farklılıklar vardır. Gelişmemiş ülkelerde *H. pylori* suşlarının çoğu Cag+ iken, gelişmiş batı ülkelerinde suşların çoğu Cag-’dir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda asemptomatik taşıyıcıların en az % 10’unun takip eden 10 yıl içerisinde klinik olarak yakınmalarının ortaya çıkacağını klinik yakınması olanlarında en az %2-4’ünde takip eden 10 yıl içerisinde mide karsinoması gelişebileceği gösterilmiştir.²³⁴

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, *H.pylori* prevalansının, ülke ve toplumların gelişmişlik düzeyleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Tüm dünya nüfusunda enfeksiyon riski, yaşla, kalabalık ortam ve sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü ile orantılı olarak artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yıllık *H.pylori* enfeksiyonu insidansı % 0,5-1 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oran % 10 civarındadır.²⁵¹ Yine benzer şekilde gelişmekte olan ülkelerde çocukların çoğu *H.pylori* ile enfekte iken, gelişmiş ülkelerde çocukluk çağında *H.pylori* prevalansı oldukça düşüktür. *H.pylori* bulaşının çoğu, çocukluk çağında meydana gelmektedir ve bazı ülkelerde çocukların hayatın ilk ayları kadar erken bir dönemde enfekte olduğunu bildiren yayınlarda çocukların yaklaşık % 90'nının 10 yaşına kadar enfekte olduğu vurgulanmıştır.²⁵² Enfeksiyon prevalansı gelişmekte olan ülkelerde % 80-100'e kadar ulaşırken, gelişmiş ülkelerde sosyoekonomik düzeye bağlı olarak % 10 ile % 50 arasında değişmektedir.²⁵³

2.14. Korunma, Kontrol ve Aşı çalışmaları

Günümüzde *H.pylori* bulaşından tam manasıyla korunma olasılığı yoktur. Özellikle gastrik kanserin yüksek olduğu toplumlarda, çocukluk çağında primer korunmanın en etkili yol olacağı düşünülmektedir. Bu hedefe ulaşabilmek için çeşitli aşı çalışmaları başlatılmıştır.²³⁵ *H.pylori*'nin eradikasyonu için gelecekte üzerinde en çok durulacak konu aşı çalışmalarıdır. Üreaz gibi çeşitli *H.pylori* antijenleriyle gerçekleştirilen profilaktik ve terapötik aşılama hayvan modellerinde kısmen başarılı olmuştur.^{236,237} Fakat insan aşılarının üretimi mide immünolojisinin tam anlaşılmasından ötürü henüz gerçekleştirilememiştir.²³⁸ Şimdiye kadar aşı çalışmalarında denenilen *H.pylori* immunojenleri arasında tüm hücre ekstraktları, Üreaz, VacA ve HSP proteinleri vardır. Rekombinant Üreaz, hem üretimin kolay olması, hem de enfeksiyona karşı korunmada ve hastalık durumunun şifasını sağlamadaki etkililiği nedeni ile insanlarda kullanılmak için yoğun çalışılan proteinlerdendir. *Lactobacillus johnsonii*'nin probiyotik olarak kullanıldığı çalışmalarda *H.pylori* enfeksiyonuna faydalı olabileceği gösterilmiştir.²³⁵ Bulaşı azaltmak için kişisel hijyen kurallarına uyulması, içme sularının dezenfeksiyonu, aynı kaptan yemek yememe gibi önlemler birçok enfeksiyon hastalığında olduğu gibi *H.pylori* bulaşında da önemlidir fakat eradikasyon tedavilerinin aktif *H.pylori* enfeksiyonu olan tüm topluma uygulanması maliyet etkinliği

ve başarı açısından tartışmalıdır. Gastroskopi sırasında kullanılan aletlerin sterilize edilmesine özen göstermenin gerekliliği açıktır. Bunu birlikte *H.pylori*'den korunma ve hastalığın kontrol yöntemleri tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Bölgemizden izole edilen *H.pylori* suşlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin tespiti ve çeşitli gastroduodenal patolojilere eşlik eden konak *IL-1* polimorfizminin değerlendirilmesi amacıyla planlanan çalışmada, Aralık 2006 ile Ekim 2007 tarihleri arasında Sağlık Bakanlığı Adana, Kahramanmaraş ve Gaziantep’te çeşitli hastanelerde dahiliye gastroenteroloji polikliniklerine gastrointestinal şikayetlerle başvuran ve endoskopi endikasyonu alan 201 hastadan alınan antrum ve/veya korpus mide biyopsisi ile kontrol grubu olarak sağlıklı kişilerden temin edilen 90 perierik kan örneği değerlendirilmeye alındı. Çalışma iki hasta grubu ve bir kontrol grubu olmak üzere 3 gruba ayrılarak gerçekleştirildi.

i. Hasta grubu: Adana ve Kahramanmaraş hastalarından elde edilen 110 biyopsi materyallerinde çalışılan moleküler parametreler:

- *glmM* PCR ile antrum ve/veya korpusta *H.pylori* genomunun araştırılması
- *cagA* geninin varlığı.
- *vacA* geninin varlığı ve *vacA* allellerinin tespiti
 - vacAs* (s1, s2)
 - vacAm* (m1, m2)
- Genotip tayini TipI genotip (*cagA*⁺ ve *vacA*⁺),
TipII genotip (*cagA*⁻ ve *vacA*^{+/-})
- Konak IL-1B polimorfizmi
 - o IL-1B -31 polimorfizminin tespiti (*CC,CT,TT*)
 - o IL-1B -511 polimorfizminin tespiti (*CC,CT,TT*)
 - o IL-1RA polimorfizminin tespiti (*S/S* allel, *L/S* allel, *L/L* allel)

ii. Hasta grubu: Gaziantep hastalarından elde edilen, daha önceden *H.pylori* pozitifliği PCR ile tespit edilen 91 mide biyopsi örneğinde çalışılan moleküler parametreler

- *cagA* geninin varlığı

- *vacA* geninin varlığı
- Genotip tayini Tip1 genotip (*cagA*⁺ ve *vacA*⁺),
Tip2 genotip (*cagA*⁻ ve *vacA*^{+/-})
- Konak *IL-1B* polimorfizmi
 - o *IL-1B* -31 polimorfizminin tespiti (*CC,CT,TT*)
 - o *IL-1B* -511 polimorfizminin tespiti (*CC,CT,TT*)
 - o *IL-1RN* polimorfizminin tespiti (S/S allel, L/S allel, L/L allel)

iii. Kontrol grubu: *IL-1* polimorfizminin belirlenmesi amacıyla herhangi bir gastrointestinal şikayeti olmayan sağlıklı kan bağıışçılarından elde edilen 90 periferik kan örneğinde çalışılan moleküler parametreler:

- o *IL-1B* -31 polimorfizminin tespiti (*CC,CT,TT*)
- o *IL-1B* -511 polimorfizminin tespiti (*CC,CT,TT*)
- o *IL-1RN* polimorfizminin tespiti (S/S allel, L/S allel, L/L allel)

Endoskopi eşliğinde alınan mide biyopsi örnekleri, 1 ml Ph 7.4 PBS (Phosphate Buffer Saline) solüsyonu içeren kapaklı steril ependorf tüplerine alınarak buz aküleri yardımı ile soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı ve örnekler işleninceye kadar laboratuvarı -20 °C de muhafaza edildi. Kontrol kan örnekleri EDTA içeren tüplere 3-5 ml kadar alındı. Laboratuvarı kontrol kan örnekleri ve biyopsi örnekleri antrum ve korpus kaynaklı olduğunu belirtecek şekilde numaralandırıldı ve kayıt altına alındı.

3.2. Çalışma Dizaynı ve Uygulanan Moleküler Yöntemler

Elde edilen mide biyopsi örneklerinden konak ve bakteriyal DNA, Qiagen QIAamp DNA Mini Kiti ile firmanın talimatları doğrultusunda izole edildi ve DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm’de ölçülerek hesaplandı. Ekstraktlarda, *H. pylori* genom varlığını araştırmak için *glmM* primer çifti (eski adı: *ureC*) kullanıldı. *H. pylori* PCR pozitif örneklerde, virulansdan sorumlu gen bölgeleri olan *cagA*, *vacA* ve *vacA*’nın subtip allellerinin (*vacA s1/s2*, *vacA m1/m2*) varlığını belirlemek amacıyla ilgili primerler ile ileri analizler yapıldı (Tablo 8, Tablo 9).

Tablo 8: Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve hedef gen uzunlukları.

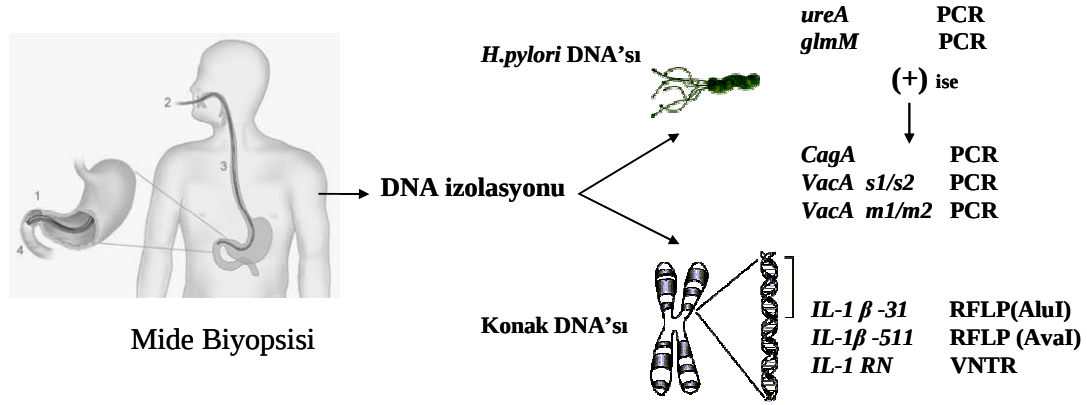
Primer	Yöntem	Dizi	Ürün Uzunluğu
<i>glmM</i>	PCR	F 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' R 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'	294 bp
<i>CagA</i>	PCR	F 5'-GATAACAGGCAA GCTTTTGAGG -3' R 5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA -3'	349 bp
<i>VacA s1/s2</i>	PCR	F 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC -3' R 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'	s1: 259 bp s2: 286 bp
<i>VacA m1/m2</i>	PCR	F 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG -3' R 5'-GCGTCAAAATAATTCCAAGG -3'	m1: 567 bp m2: 642 bp
<i>IL-1 β -31</i>	RFLP (AluI)	F 5'- AGAAGCTTCCACCAATACTC -3' R 5'-AGCACCTAGTTGTAAGGAA -3'	239 bp (137, 102bp)
<i>IL-1β -511</i>	RFLP (AvaI)	F 5'- GCCTGAACCCTGCATACCGT -3' R 5'-GCCAATAGCCCTCCCTGTCT -3'	155 bp (92, 63 bp)
<i>IL-1 RN</i>	VNTR	F 5'- CCCCTCAGCAACACTCC -3' R 5'-GGTCAGAAGGGCAGAGA -3'	240, 325, 410, 530 ve 595 bp

Tablo 9: Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin moleküler özellikleri.

Primer	Baz sayısı (bp)	GC %	TM (Melting point)	Safılık	Miktar
<i>glmM</i>	F 25 R 24	44 37,5	61,3°C 57,6 °C	HPLC HPLC	52,1 nmol 63,4 nmol
<i>CagA</i>	F 22 R 22	45,5 40,9	58,4 °C 56,5 °C	HPLC HPLC	52,9 nmol 49,5 nmol
<i>VacA s1/s2</i>	F 21 R 19	33,3 52,6	52,0 °C 56,7 °C	HPLC HPLC	54,5 nmol 58,4 nmol
<i>VacA m1/m2</i>	F 21 R 20	47,6 40	57,9 °C 53,2 °C	HPLC HPLC	55,8 nmol 52,0 nmol
<i>IL-1 β -31</i>	F 20 R 19	45 42,1	58,0 °C 54,0 °C	HPLC HPLC	46,9 nmol 45,2 nmol
<i>IL-1β -511</i>	F 2 R 20	60 60	64,0°C 64,0°C	HPLC HPLC	50,3 nmol 53,5 nmol
<i>IL-1 RN</i>	F 17 R 17	64,7 58,8	56,0 °C 54,0 °C	HPLC HPLC	62,5 nmol 47,7 nmol

Biyopsi örneklerinde bakteriyal DNA ile eş zamanlı olarak izole edilen konak genomunda 2. kromozomda bulunan *IL-1β -511* ve *IL-1β -31* bölgelerinde Sitozin-Timin polimorfizmlerini belirlemek için PCR-RFLP, *IL-1β* reseptör antagonisti (*IL-1β*

RN) polimorfizmini belirlemek amacıyla PCR-VNTR moleküler yöntemleri kullanıldı (Şekil 3).



Şekil 3: Çalışma Dizaynı; biyopsi örneğinin alınması, DNA izolasyonu ve hedeflenen konak ve bakteriyel gen bölgeri.

3.2.1. Biyopsi ve Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

H.pylori DNA'sının ekstraksiyonu için QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (Lot No: 12187870, Cat No: 51304) doku ekstraksiyon kiti kullanıldı.

Ekstraksiyon üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

- QIAamp spin columns,
- Koleksiyon tüpleri (2ml),
- Buffer AL,
- Buffer AW1,
- Buffer AW2,
- Buffer AE,
- Proteinaz K.

1. Mideden alınan yaklaşık 25 mg doku örnekleri, içerisinde bulundukları PBS'den uzaklaştırmak için santrifüjlendi, sıvı kısım uzaklaştırıldı ve 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı. Bunların üzerlerine 180 µl ATL buffer (doku lizis tamponu) ve 20 µl

pK (proteinaz K) eklenip vortekslendi ve enzimin optimum çalışma ısısı olan 56°C’de bir gece bekletilerek tam olarak erimesi sağlandı.

2. İnkübasyondan sonra kısaca santrifüj edilerek kapakta sıvı kalmaması sağlandı. Üzerine 200 µl AL buffer (guanidine hydrochloride + guanidine tuzları) eklenip 15 sn vorteks yapıldı ve 70°C’de 10 dk bekletilerek pK inhibe edildi. Tekrar kısaca santrifüj edildi.

3. Üzerine 200 µl soğuk etanol (% 96-100) eklenip 15 sn. vorteks yapıldı. Kısaca santrifüj edildi.

4. Karışım 2 ml’lik toplama tüpü içindeki QIAamp spin kolonlara kenarlarını ıslatmadan boşaltıldı ve 6000 x G’de 1 dk. santrifüj edildi (Heraeus Biofuge Primo R). Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, içi sıvı dolu olan tüp atıldı.

5. Filtrenin üzerine kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW1 buffer (yıkama solusyonu: guanidium isothiocyanate + etanol) eklenip 6000 x G’de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, içi sıvı dolu olan tüp atıldı.

6. Filtrenin üzerine kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW2 buffer (yıkama solusyonu: yüksek konsantrasyonda tuz + etanol + sodyum azit) eklenip 20000 x G’de 3 dk santrifüj edildi (Gerek duyulduğunda bu aşama tekrar edildi).

7. Spin kolon yeni temiz bir 1,5 ml’lik ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 µl AE buffer veya distile su eklendi ve oda ısısında 1 dk bekletilip, 6000 x G’de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon atıldı ve tüpteki sıvıda eksrakte edilmiş DNA kaldı. İzole edilen kalıp DNA, çalışmada kullanılana kadar -20/-70°C’de muhafaza edildi.

Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonunda EDTA ile temin edilen 3-5 cc kan örneği 3500 rpm’de 3 dk çevrildi, nötrofillerin ve diğer çekirdekli hücrelerin bol olarak bulunduğu buffy coat’tan örnek alınarak ekstraksiyon kitinin aşamalarına aynı şekilde devam edildi.

3.2.2. Ekstrakte Materyalde DNA Miktarının Spektrofotometre ile Ölçülmesi

Ekstrakte edilmiş DNA içeren ependorf tüpleri, spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

DNA miktarı:

$$\text{DNA mg /ml} = \frac{\text{OD260} \times 50 \text{ mg DNA/ml} \times \text{Dilüsyon Oranı}}{1000 \text{ ml/ml}} \quad \text{formülü ile hesaplandı.}$$

Ekstrakte edilen DNA miktarının 3-12 µg/µl olduğu tespit edildi. Daha sonra bu tüpler çalışma süresince -20/-70°C’de saklandı.

3.2.3. Pozitif Kontrol Suşunun Canlandırılması ve DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada *H.pylori* pozitif kontrol suşu olarak *H.pylori* NCTC 99 (Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür koleksiyonu, RSKK no: 050147) suşu kullanıldı. Liyolize halde gelen suş 1 cc BHIB (Brain Heart Infusion Broth) içerisinde 37°C’de 2 saat inkübe edilerek Columbia agar (Biomérieux) besiyerine (antimikrobiyal ve IsoVitaleX supplamenti ilaveli) inoküle edildi. Mikroaerofilik kit (Campygen, Oxoid, Lot: 13L08-C25-14) yardımı ile 37°C’de 4 gece inkübe edildi. İnkübasyon periyodu sonrasında kontaminasyon açısından kontrol edildi ve Oksidaz (+), Üreaz (+), Gram (-) bakteri kolonileri *H.pylori* olarak tanımlandı. Üreyen koloniden *H.pylori* DNA izolasyonu için Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit kullanıldı.

3.2.4. *H.pylori glmM (ureC)* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

glmM genini tespit etmek amacıyla bu gene spesifik 294 bp uzunluğundaki gen fragmentini hedef alan *glmM*-F 5’- AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T -3’ ve *glmM*-R 5’- AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC -3’ primerleri sentez ettirildi (Ella Biotech GmbH, Deutschland) (Tablo 8). Liyofilize halde gelen primerler steril bidistile su ile 100 pmol/µl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde PCR buffer (10 X Mg free, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100) 5 µl, MgCl₂ (25mM) 5 µl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 µl, her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl) 0,5 µl, Taq DNA polimeraz (Vivantis, 5 u/µl U) 0,25 µl, steril distile su 32,75 µl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden ve pozitif kontrol örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler’a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

1. 94° C’de 4 dk. - ilk denaturasyon
2. 94° C’de 1 dk. - denaturasyon
57° C’de 1 dk. - bağlanma
72° C’de 1 dk. - uzama
3. 72° C’de 7 dk. - son uzama (extension) ve +4 °C’de bekleme konumu.

35 döngü

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

3.2.5. *H.pylori CagA* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

cagA genini tespit etmek amacıyla bu gene spesifik 349 bp uzunluğundaki gen fragmentini hedef alan *cagA* F 5’- GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G -3’ ve *CagA* R 5’- CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A -3’ primerleri sentez ettirildi (Tablo 8). Liyofilize halde gelen primerler steril bidistile su ile 100 pmol/μl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 50 μl olacak şekilde PCR buffer (10 X Mg free, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100) 5 μl, MgCl₂ (25mM) 5 μl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 μl, herbir primer çiftinden (stok 100 pmol/μl) 0,5 μl, Taq DNA polimeraz (Vivantis 5 u/μl U) 0,25 μl, steril distile su 27,7 μl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 10 μl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler’a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

1. 94° C’de 4 dk. - ilk denaturasyon
2. 94° C’de 1 dk. - denaturasyon
57° C’de 1 dk. - bağlanma
72° C’de 1 dk. - uzama
3. 72 °C’de 7 dk. - son uzama ve +4 °C’de bekleme konumu.

35 döngü

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

3.2.6. *H.pylori vacA s1/s2* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

vacA s genini tespit etmek amacıyla bu gene spesifik 259 bp (s1) ve 286 (s2) bp uzunluğundaki gen fragmentini hedef alan *vacAs-F* 5'-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC ve *vacAs-R* 5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C primerleri sentez ettirildi (Tablo 8). Liyofilize halde gelen primerler steril bidistile su ile 100 pmol/μl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 50 μl olacak şekilde PCR buffer (10 X Mg free, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100) 5 μl, MgCl₂ (50mM) 2 μl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 μl, herbir primer çiftinden (stok 100 pmol/μl) 0,5 μl, Taq DNA polimeraz (Vivantis 5 u/μl) 0,25 μl, steril distile su 35,75 μl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 μl eklendi ve amplifikasyon için termal cykler'a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

1. 94° C'de 4 dk. - ilk denaturasyon
 2. 94° C'de 1 dk. - denaturasyon
 - 57° C'de 1 dk. - bağlanma
 - 72° C'de 1 dk. - uzama
 3. 72 °C'de 7 dk. - son uzama ve +4 °C'de bekleme konumu.
- } 35 döngü

Amplifiye olan s1 ve s2 gen bölgelerinin elektroforezde ayırımını artırmak için %3'lük agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

3.2.7. *H.pylori vacA m1/m2* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

vacA m genini tespit etmek amacıyla bu bölgeye spesifik 570 (m1) ve 645 (m2) bp uzunluğundaki gen fragmentini hedef alan *vacA-m F* 5'- CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG ve *vacA-m R* 5'-GCG TCA AAA TAA TTC CAA GG primerleri sentez ettirildi (Tablo 8). Liyofilize halde gelen primerler steril bidistile su ile 100 pmol/μl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 50 μl olacak şekilde PCR buffer (10 X Mg free, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100) 5 μl, MgCl₂ (50mM) 1 μl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 μl, herbir primer çiftinden (stok 100 pmol/μl) 0,5 μl, Taq DNA polimeraz (Vivantis 5 u/μl) 0,25 μl, steril distile su 36,75 μl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek

olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler'a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

1. 94° C'de 4 dk. - ilk denaturasyon
 2. 94° C'de 1 dk. - denaturasyon
 - 57° C'de 1 dk. - bağlanma
 - 72° C'de 1 dk. - uzama
 3. 72° C'de 7 dk. - son uzama ve +4 °C'de bekleme konumu.
- } 35 döngü

Amplifiye olan m1 ve m2 gen bölgelerinin elektroforezde ayırımını kolaylaştırmak için jel konsantrasyonu artırılarak %3'e çıkarıldı ve elektroforez gerçekleştirildi.

3.2.8. Konak doku polimorfizminin belirlenmesi

3.2.8.1. *IL-1B* geni -511 bölgesinin Amplifikasyonu

Konakta 2. kromozomun uzun kolunda yer alan *IL-1β* geninin, promoter bölgesi - 511'inci bazda bulunan tek nokta polimorfizmini (C/T baz transizyonu) tespit etmek amacıyla bu bölgeye spesifik 155 bp uzunluğundaki gen fragmentini hedef alan 511-F 5'- GCC TGA ACC CTG CAT ACC GT-3' ve 511-R 5'- GCC AAT AGC CCT CCC TGT CT-3' primerleri sentez ettirildi (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Germany) (Tablo 8). Liyofilize halde gelen primerler ultra pür su ile 100 pmol/µl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde PCR buffer (5 X Mg free, Promega) 10 µl, MgCl₂ (25mM, Fermentas) 4 µl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 µl, her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl, TIB Molbiol) 0,8 µl, GoTaq Flexi DNA polimeraz (Promega, 5 u/µl, lot:243796) 0,25 µl, steril distile su 28,15 µl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler'a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

1. 95° C'de 5 dk. - ilk denaturasyon
2. 94° C'de 30 sn. - denaturasyon

- | | | |
|---|---|----------|
| 64° C’de 30 sn. - bağlanma | } | 5 döngü |
| 72° C’de 30 sn. - uzama | | |
| 3. 94° C’de 30 sn. - denaturasyon | } | 35 döngü |
| 59° C’de 30 sn. - bağlanma | | |
| 72° C’de 30 sn. - uzama | | |
| 3. 72 °C’de 7 dak. - son uzama ve + 4 °C’de bekleme konumu. | | |

Amplifikasyon ürünleri %0,5 mg/ml Etidyum bromid bulunan %2’lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve non-spesifik bantlar yönünden kontrol edildi. Jel görüntüleme sistemi ile resimleri çekildi.

3.2.8.1.1. Amplifiye edilen örneğin Eco88I (AvaI) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi

Enzim ile kesilmeden önce PCR ile amplikondaki DNA miktarı, spektrofotometri ile ölçülerek belirlendi. 155 bp uzunluğundaki amplikon Eco88I (AvaI) (Fermentas Life Science, 1000 U, 10 u/μl lot: 021325) restriksiyon enzimi ile kesildi. Şekil 4’de enzimin tanıma bölgesi gösterilmektedir.



Şekil 4: Eco88I (AvaI) enziminin tanıma bölgesi.

RFLP Uygulaması:

1- Amplifiye edilen örneklerden 3 μl alınarak 20 μl’lık reaksiyon karışımı hazırlandı.

Eco88I (10U/μl) 0,2 μl

Buffer Tango(10X, with 1 mg/ml BSA 2 μl

Kalıp DNA 3 μl

Ultra pür su 14,8 μl

Toplam hacim 20 µl

2- 220 dk. 37°C’de inkübe edildi.

3- 65°C’de 15 dk. inkübe edilerek enzim inaktive edildi.

4- %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV ışığında görüntülendi.

5- Elde edilen fragment büyüklüğü ve sayısına göre genotip tayini yapıldı. Bunun için, 155 bp kesilmemiş ampikon T (T/T) alleli, 80 ve 95 bp’lik iki ürün C (C/C) alleli olarak kabul edildi. Genotipler, kesilen ampikonların jel elektroforezinde gösterdikleri fragment profil polimorfizmine göre aşağıdaki şekilde tanımlandı.

C/C: 92 ve 63 bp’lik iki bant

C/T: 155, 92 ve 63 bp’lik üç bant

T/T: kesilmemiş 155 bp’lik tek bant.

3.2.8.2. *IL-1B* Geni -31 Bölgesinin Amplifikasyonu

Konakta 2. kromozom uzun kolunda yer alan yer alan *IL-1β* geninin, -31’inci bölgede bulunan tek nokta mutasyonunu (T/C baz transizyonu) tespit etmek amacıyla bu bölgeye spesifik 239 bp uzunluğundaki gen fragmentini hedef alan F-5’- AGA AGC TTC CAC CAA TAC TC -3’ ve R-5’-AGC ACC TAG TTG TAA GGA A-3’ primerleri sentez ettirildi (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Germany), (Tablo 8). Liyofilize halde gelen primerler steril ultra pür su ile 100 pmol/µl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlandı. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde PCR buffer (5 X Mg free, Promega) 10 µl, MgCl₂ (25mM, Promega) 5 µl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 µl, her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl) 0,8 µl, GoTaq Flexi DNA polimeraz (5 u/µl, Promega) 0,25 µl, steril distile su 24,65 µl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 7,5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler’a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

- | | |
|--------------------------------------|------------|
| 1. 94° C’de 4 dk. - ilk denaturasyon | |
| 2. 94° C’de 30 sn. - denaturasyon | |
| 57° C’de 30 sn. - bağlanma | |
| | } 40 döngü |

72° C’de 40 sn. - uzama

3. 72 °C’de 7 dak. - son uzama ve +4 °C’de bekleme konumu.

Amplifikasyon ürünleri %0,5 mg/ml Etidyum bromid bulunan %2’lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutularak non-spesifik amplifikasyon yönünden değerlendirildi. Ultra viole ışığı ile görüntülenerek resimleri çekildi.

3.2.8.2.1. Amplifiye Edilen Örneğin AluI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesilmesi

Enzimin etki edeceği substrat konsantrasyonu standardizasyonu için ampikon içerisindeki DNA miktarı enzim ile kesilmeden önce, spektrofotometri ile ölçülerek standardizasyon sağlandı. Kesilen örnek enzim karışım içerisinde 1-2 µg DNA olacak şekilde dilüe edildi. 239 bp uzunluğundaki ampikon AluI (10 U/µl, 600 U, Fermentas, Lot:026039) restriksiyon enzimi ile kesildi. Şekil 5’de enzimin tanıma bölgesi gösterilmektedir.



Şekil 5. AluI restriksiyon enziminin kesim noktası.

Reaksiyon 20 µl hacimde 37° C, 3 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi. Süre sonunda 56° C’de 10 dk inkübasyon ile enzim aktivitesi sonlandırıldı.

RFLP Uygulaması:

1-Amplifiye edilen örneklerden 3µl alınarak aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

AluI (10u/µl)	0,2 µl
Buffer (10X)	2,0 µl
Kalıp DNA	3,0 µl
Distile su	14,8 µl
Toplam hacim	20 µl

(AluI: Sigma-Aldrich Product No: R 6885, Ürün İçeriği: AluI enzim (10 u/µl), 10X Buffer (20Mm Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1mM EDTA, 10 mM dithioerythritol (DTE), % 50 v/v gliserol)

2- 3 saat 37°C’de inkübe edildi.

3- 65°C’de 15 dk. inkübe ederek enzim inaktive edildi.

4- Agaroz jel elektroforezinde (% 3’lük) analiz edildi.

5- Elde edilen fragment büyüklüğü ve sayısına göre mutasyon analizi yapıldı.

Bunun için, 155 bp parçalanmamış ürün T alleli, 80 ve 95 bp’lik iki ürün C alleli olarak kabul edildi. Genotipler aşağıdaki gibi tasarlandı.

C/C: 92 ve 63 bp’lik iki bant

C/T: 155, 92 ve 63 bp’lik üç bant

T/T: sindirilmemiş 155 bp’lik tek bant.

3.2.9. *IL-1RN* Geninde Gekrar Gden Gen Bölgelerinin (VNTR) Amplifikasyonu

IL-RN geni penta-allelilik 86 bp’lik ard arda tekrar eden bölgelere (variable number of tandem repeats, VNTR) sahiptir. *IL-RN* polimorfizmi, 86 bp’lik tekrar eden bölgelerin sayısının PCR-VNTR ile amplifikasyonu ile belirlendi. 2. kromozomun uzun kolunda, 2. intronda yer alan bu bölgeye spesifik VNTR-F 5’-CCCCTCAGC AACACTCC-3’ ve VNTR-R 5’-GGTCAGAAGGGCAGAGA-3’ primerleri kullanıldı. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde PCR buffer (5 X Mg free) 10 µl, MgCl₂ (25mM) 4 µl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 0,8 µl, her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl) 0,8 µl, Taq DNA polimeraz (Promega, 5 u/µl) 0,25 µl, steril distile su 25,85 µl eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 7,5 µl eklendi ve amplifikasyon için “termal cyler” a yerleştirildi.

Amplifikasyon aşamaları şu şekilde programlandı:

- | | | |
|--------------------------------------|---|----------|
| 1. 94° C’de 5 dk. - ilk denaturasyon | } | 5 döngü |
| 2. 94° C’de 30 sn. - denaturasyon | | |
| 64° C’de 30 sn. - bağlanma | | |
| 72° C’de 30 sn. - uzama | | |
| 3. 94° C’de 30 sn. - denaturasyon | } | 35 döngü |
| 59° C’de 30 sn. - bağlanma | | |

72° C’de 30 sn. - uzama

4. 72 °C’de 7 dak. - son uzama ve +4 °C’de bekleme konumu.

Amplifikasyon ürünleri %0,5 mg/ml Etidyum bromid bulunan %2’lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabii tutuldu. Ultra viole ışığı ile görüntülenerek resimleri çekildi.

Alleller 100 bp’lik DNA markera göre kıyaslanarak aşağıdaki gibi kodlandı.

allel 1= 410 bp (dört tekrar),

allel 2= 240 bp (iki tekrar),

allel 3= 530 bp (beş tekrar),

allel 4= 325 bp (üç tekrar),

allel 5= 595 bp (altı tekrar).

Bu alleller daha sonra kısa allel (allel 2=S) veya uzun allel (allel 1, 3, 4 ve 5=L) olarak sınıflandırıldı. Genotipik patern L/L, L/S ve S/S olarak sınıflandırıldı.

3.2.10. Amplifiye Edilen Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi

Elektroforez tankının doldurulmasında ve jel hazırlanmasında 1X TBE solüsyonu pH 8,4 (Tris Base, Borik asit, EDTA) kullanıldı.

3.2.10.1. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Elektroforez için %2-3,5 konsantrasyonlarda çeşitli agaroz jel hazırlamak için 1X TBE (Tris Base, Borik asit, EDTA) karışımı hazırlandı. 10X TBE stok solüsyonundan 10 ml alınarak 90 ml distile su ile karıştırılarak 1X yoğunluğunda çözelti hazırlandı. Moleküler saflıkta agarozdan 2 g tartıldı. Bir cam balon içerisinde mikrodalga fırında eritilerek oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğumaya yakın içerisine 5 µl etidyum bromit (stok 10 mg/ml) eklendi ve jel tankına (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) döküldü. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilerek katılaşması sağlandı. Jel donduktan sonra taraklar çekilerek kuyucuklar hazırlandı ve jel tankı hazırlanan 1X TBE solüsyonu ile yeteri miktarda dolduruldu.

3.2.10.2. Amlikonların Agaroze Jele Yerleştirilmesi

Amplifiye olan DNA örneklerinden 10 µl alınarak 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı ve kuyucuklara yerleştirildi. Marker olarak 100 bp'lik DNA markerdan 5 µl alınarak ilk kuyucuğa ve orta kuyucuğa 5 µl hacimde yerleştirildi.

Tankın güç kaynağı (Labnet International Power Station 300) çalıştırılarak 80 mA – 120 V akım verildi ve 1 saat elektroforez sürdürüldü. Yükleme tamponundaki bromfenol mavisi jelin 2/3'üne ulaştığında elektroforez durduruldu.

3.2.10.3. Agoroze Jelin Görüntülenmesi

Elektroforez sonrası jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 1500 Imaging System) ile 312 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı altında görüntülenerek incelendi ve resimleri çekildi. Hedef bölge ile uyumlu ampiklonlar pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 6,7,8 ve 9).

3.3. PCR İçin Kullanılan Sarf Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması

Moleküler testlerde kullanılmak üzere belirtilen solüsyonlar hem stok hemde günlük olarak hazırlandı.

3.3.1. PBS (Phosphate Buffer Saline, 1 X) Hazırlanması

PBS solüsyonu biyopsi örneklerinin laboratuvara taşınması amacı ile kullanıldı.

NaCl 17 g/l

NaH₂PO₄ 0.44 g/l

K₂HPO₄ 2.4 g/l (Ph 7,4)

Belirtilen maddeler tartılarak 1 litre distile su içinde çözüldü ve otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Steril kapaklı ependorf tüplerine 1'er ml dağıtıldı. +4°C'de muhafaza edildi.

3.3.2. 10X TBE (pH: 8.8) Solüsyonunun Hazırlanması

Tris-base 108 g,
Borik asit 55 g,
EDTA 8.3 g tartılarak 1 litre distile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Oda ısısında muhafaza edildi. (Tris-base Sigma, MW: 121.14 g, Lot: 116K5454; Borik asit Merck MW: 61,83 g, Lot: A577065; EDTA Ambresco MW: 372,24 8.3 g, Lot: 1810B22)

3.3.3. dNTP Karışımının Hazırlanması

PCR ana karışımında (master mix) kullanılacak olan 10mM dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate, Promega Lot: 237687) hazırlandı. Bunun için herbiri 100 mM stok konsantrasyonda gelen dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'tan 10'ar µl alınarak 60 µl ultrapür su eklendi. Kullanılncaya kadar -20/-70°C'de muhafaza edildi.

3.3.4. DNA Markerların Hazırlanması

Elektroforez sırasında hedef gen bölgesinin amplifikasyonunun kontrolünde ve amplikon büyüklüğünün ölçümünde 25 bp'lik ve 100 bp'lik büyüklüklerde açılan markerlar (Promega 25 bp DNA step ladder, Cat: G4511, Lot: 110567, Fermentas 100 bp DNA ladder, Lot: 015332) kullanıldı. Bunun için stok primer solüsyonundan 50 µl, 6X yükleme tamponunun 10 µl alınarak kullanıma hazır hale getirildi ve kullanılncaya kadar -20/-70°C'de muhafaza edildi.

3.3.5. Yükleme Tamponunun Hazırlanması

Elektroforez sırasında jel kuyucuklarına amplikonların yerleşmesi için yükleme tamponu (loading buffer, pH 8,2) hazırlandı. Bunun için solüsyona brom fenol mavisi eklemeden önce aşağıdaki sarf maddelerinden aşağıda belirtilen miktarlarda tartılarak, pH'sı 1 N NaOH ile ayarlandı ve ürün +4°C'de muhafaza edildi.

Brom fenol mavisi 0,0125 mg.

Sukroz 2 gr.

Gliserol 5 damla
1X TE (pH 8.2) 5 ml.

3.3.6. Etidyum Bromit ile Boyama

Çalışmada agaroz jelin boyanması için 10 mg/ml stok konsantrasyonda sıvı etidyum bromit (Promega, Lot: 234571) kullanıldı. 100 ml donmamış agaroz jel içerisinde 5 µl etidyum bromit ekledi ve jel donmaya bırakıldı. Stok boya oda ısısında muhafaza edildi.

3.3.7. Agaroz

PCR ürünlerinin jel elektroforezi için DNaz ve RNaz aktivitesi olmayan moleküler saflıkta agaroz (Prona Agarose, Lot: 041277PR) kullanıldı. Oda ısısında muhafaza edildi.

3.3.8. Taq DNA Polimeraz

PCR ile amplifikasyon karışımının hazırlanmasında her örnek başına 1,25 u Taq polimeraz (Stok 5 u/µl) enzimi kullanıldı. Enzim -20/-70 C°'de muhafaza edildi.

3.3.9. Primer Seçimi, Kontrolü ve Liyofilize Primerlerin Kullanıma

Hazırlanması

Konak ve bakteriyel DNA'da hedeflenen 7 gen bölgesinin moleküler yöntemlerle ile incelenmesinde kritik öneme sahip olan primerlerin dizisinin belirlenmesi ve ticari olarak sentezlenmesi için ayrıntılı literatür taraması yapıldı ve GeneBank'tan ilgili hedef gen bölgelerinin tüm sekansı incelenerek hem primerler hem restriksiyon endonükleaz enzimleri elektronik ortamda test edildi. Bunun için FastPCR V 5.2.102 yazılımı kullanıldı.²³⁹ Belirlenen primer dizileri HPLC pürifiye, liyofilize olarak temin edildi. Ultrapür su ile 100 pmol/µl'lik stok primerler hazırlanarak -20/-70°C'de muhafaza edildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz testlerinin uygulanması için elde edilen veriler rakamsal olarak kodlanarak SPSS V11.5 programına yüklendi. Veri kontrolü yapıldı ve bulguların istatistiksel analizi için χ^2 Fisher exact testi kullanıldı.²⁴⁰

4. BULGULAR

Bölgemizden izole edilen *H. pylori* suşlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin tespiti ve çeşitli gastroduodenal patolojilere eşlik eden konak *IL-1B* polimorfizminin değerlendirilmesi amacıyla planlanan çalışmada 90'i kontrol grubu olmak üzere toplam 291 klinik örnek çeşitli moleküler yöntemlerle incelendi.

4.1. Hasta Grubunun (Adana ve Kahramanmaraş) Demografik Verileri ve Elde Edilen Diğer Bulgular

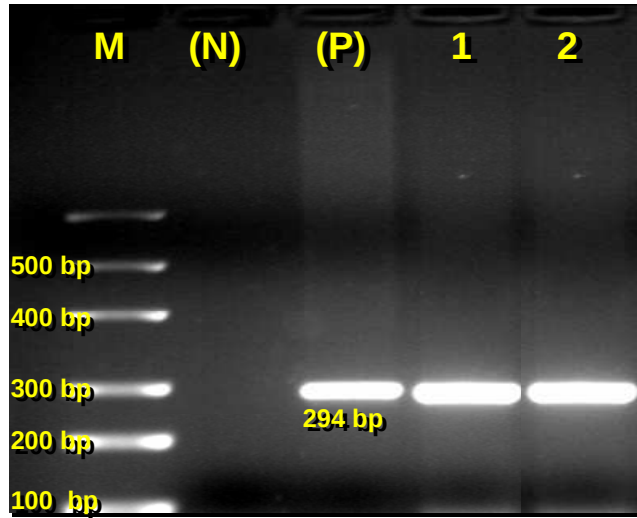
Çalışmaya dahil edilen yaş ortalamaları 46,05 ($\pm 11,92$), 23'ü erkek (% 20,9), 87'si kadın (% 79,1) toplam 110 semptomatik hastadan endoskopi ile antrum ve/veya kospus kaynaklı mide biyopsi örneği temin edildi (Tablo:10). Hastaların endoskopik muayenelerinde 117 hasta gastrit tanısına (antral gastrit ve/veya pangastrit), 3'ü ise ülser (gastrik ülser veya duodenal ülser) tanısına sahipti. Biyopsi materyalinde *H.pylori* genom varlığını tespit edebilmek için *glmM* primerlerinin kullanıldığı In-House PCR yöntemi ile 110 hastanın 89 (% 80,9)'unda bakteri varlığı belirlendi. Şekil 6'da 294 bp'lik *glmM* amplikonunun % 1,8'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü görülmektedir.

Hastaların önemli bir oranı, endoskopik muayene sonucu gastrit (pangastrit/ antral gastrit) kliniğe sahip hastalardan oluşmaktadır. Tablo 10'da ayrıntılı demografik bilgiler özetlenmiştir.

Tablo 10: 1. Hasta grubunun demografik özellikleri, *H.pylori* prevalansı ve endoskopik bulgular.*

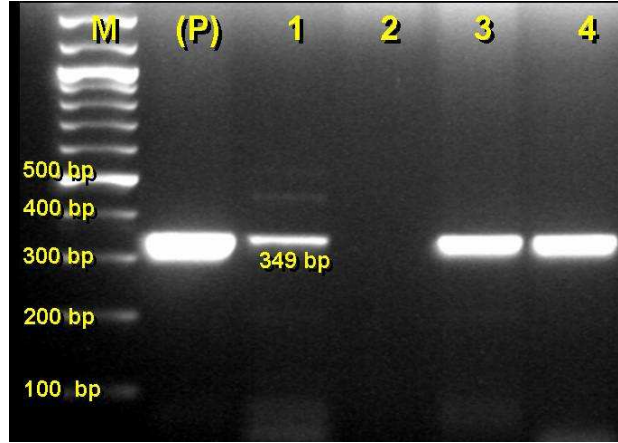
		Yaş grupları 46,0 (± 11.9)				Endoskopik bulgular		n(%)
<i>H.pylori</i>								
PCR		18-30	31-41	41-50	51-75	Gastrit	Ülser	Toplam
	Negatif							
	Erkek	0	0	5	3	7	1	8
	Kadın	0	5	3	5	12	1	13
	Toplam	0	5	8	8	19	2	21
Pozitif								
	Erkek	0	4	4	7	14	1	15
	Kadın	9	20	19	26	74	0	74
	Toplam	9	24	23	33	88	1	89 (% 80,9)

*: Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen *H.pylori* suşları



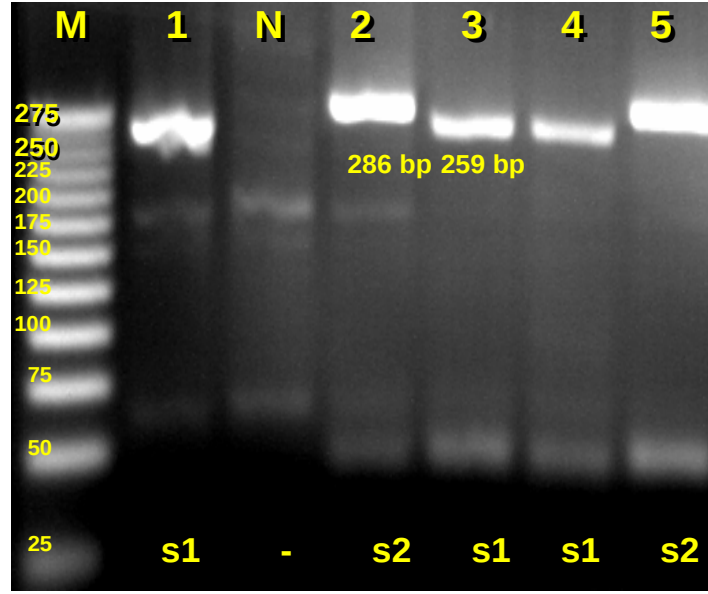
Şekil 6: 294 bp'lik *glmM* amplikonunun % 1,8'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü (M: 100 bp'lik marker, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol, 1-2: hasta örnekleri)

H. pylori suşlarının 57'sinin (% 64,0) *cagA* geni taşımakta olan Tip I genotipinde (*cagA*+, *vacA*+) yer aldıkları, 32'sinin de (% 36,0) Tip II genotipinde (*cagA*- ve *vacA*+/-) yer aldığı belirlendi (Şekil 7, Tablo 11).

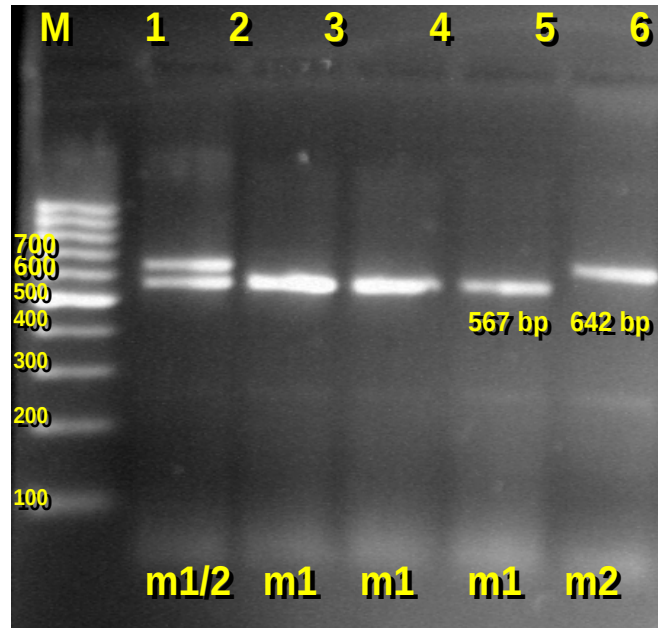


Şekil 7: 349 bp'lik *cagA* amplikonunun % 1,8'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü (M: 100 bp'lik marker, P: pozitif kontrol, 1-4: hasta örnekleri)

vacA s ve/veya m gen bölgesini taşıyan *H.pylori* oranı 86 (% 96,62) izolatta tespit edilirken hedeflenen *vacA* gen bölgesinin PCR ile 3 izolatta olmadığı tespit edildi (şekil 8, şekil 9, tablo 11). Suşların 51'i (% 57,30) *vacAs1* gen bölgesine, 27'si (% 30,33) *vacAs2* gen bölgesine, 2'si (% 2,24) her iki s bölgesini de taşımakta idi. (şekil 8) 9 suşta ise *vacA* s bölgesi yoktu. Suşların 31'i (% 34,83) *vacAm1* gen bölgesine, 48'si (% 53,9) *vacAm2* gen bölgesine 3'ü (% 3,4) her iki m bölgesini de taşımakta idi. 7 suşta ise (% 7,9) *vacA* m bölgesi tespit edilmedi (şekil 9). *H.pylori* izolatlarında *vacA* allellerinden *vacA s1/m2* kombinasyonu (25 suş) en sık tespit edilen subtip olarak belirlenirken bunu takiben sırayla *s1/m1*(23 suş), *s2/m2* (19 suş) *vacA* allel kombinasyonu tespit edildi. *vacA* geninin alt tipleri (*s1,s2* ve *m1,m2*) tablo 13'de özetlenmiştir. *H.pylori* suşlarında *cagA* ile ilişkili *vacA* allellerinin prevalansı tablo 12'de özetlenmiştir.



Şekil 8: 259 bp (s1) ve 286 bp (s2) uzunluklarındaki amplikonların % 3'lük agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü (M: 25 bp'lik marker, N: negatif kontrol, 1-5:hasta örnekleri)



Şekil 9: 567(m1) bp ve 642(m2) bp'lik *vacA m* amplikonunun % 3'lük agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü (M:100 bp'lik marker, 1-6: hasta örnekleri)

Tablo 11: Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen *H.pylori* suşlarının cinsiyete göre dağılım oranları ve genotipik özellikleri.

	<i>H.pylori</i> PCR		<i>cagA</i>		<i>vacA</i>		Tip1 genotip	Tip2 Genotip
	n(%)		n(%)		n(%)		n(%)	
Cinsiyet	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif		
Erkek	8	15	5	10	1	14	10	5
Kadın	13	74	27	47	2	72	47	27
Toplam	21(19,1)	89(80,9)	32(35,9)	57(64,0)	3(3,3)	86(96,7)	37(64,0)	32(36,0)

Tablo 12 : Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen *H.pylori* suşlarında *cagA* ile ilişkili *vacA* allellerinin prevalansı.

	VacA s alleller				VacA m alleller				Toplam
	<i>vacAs</i> (-)	s1 (+)	s2(+)	s1 ve s2 (+)	<i>vacAm</i> (-)	m1 (+)	m2(+)	m1 ve m2 (+)	
<i>cagA</i>									
Negatif	9	10	12	1	7	7	17	1	32
Pozitif	0	41	15	1	0	24	31	2	57
Toplam	9	51	27	2	7	31	48	3	89

Tablo 13: *vacA* geninin s ve m alt tip kombinasyonlarının prevalansı*

		<i>vacAm</i> gen bölgesi alt tip				Toplam
		negatif	m1 pozitif	m2 pozitif	m1+m2 pozitif	
<i>vacAs</i> gen bölgesi	negatif	4	1	3	1	9
alt tip	s1 pozitif	2	23	25	1	51
	s2 pozitif	1	6	19	1	27
	s1+s2 pozitif	0	1	1	0	2
Toplam		7	31	48	3	89

*: Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen *H.pylori* suşları

Konakdaki doku polimorfizmini tespit etmek amacıyla yapılan *IL-1B* polimorfizm analizinde, 53 (% 48,2) hastada -511'de CT, 40 (% 36,4) hastada CC ve

17 (% 15,5) hastada TT polimorfizmi tespit edilirken 55 (% 50) hastada *IL-1B* -31 de CT, 20 (% 18,2) hastada CC ve 35 (% 31,8) hastada TT polimorfizmi tespit edildi. *IL-1 RN* polimorfizm analizinde 8 (% 7,3) hastada S/S alleli tespit edildi. Tablo 14’de *IL-1* polimorfizm durumunun cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılım oranları görülmektedir.

Tablo 14: *IL-1* polimorfizm durumunun cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılım oranları.*

Polimorfizm		<i>IL-1B</i> -31 n(%)			<i>IL-1B</i> -511 n(%)			<i>IL-1 RN</i> n(%)			Toplam
		CT	CC	TT	CT	CC	TT	S/S	L/S	L/L	
Cinsiyet											
Erkek	31-41 yaş	2	1	1	2	1	1	0	1	3	4
	41-50 yaş	6	1	2	4	5	0	0	4	5	9
	51-75 yaş	6	1	3	6	3	1	1	3	6	10
	Toplam	14	3	6	12	9	2	1	8	14	23
Kadın	18-30 yaş	4	0	5	3	5	1	1	2	6	9
	31-41 yaş	13	3	9	14	10	1	2	9	14	25
	41-50 yaş	12	6	4	9	6	7	2	9	11	22
	51-75 yaş	12	8	11	15	10	6	2	16	13	31
	Toplam	41	17	29	41	31	15	7	36	44	87
Genel Toplam		55(50)	20(18.2)	35(31.8)	53(48.2)	40(36.4)	17(15.5)	8(7.3)	44(40.0)	58(52.7)	110

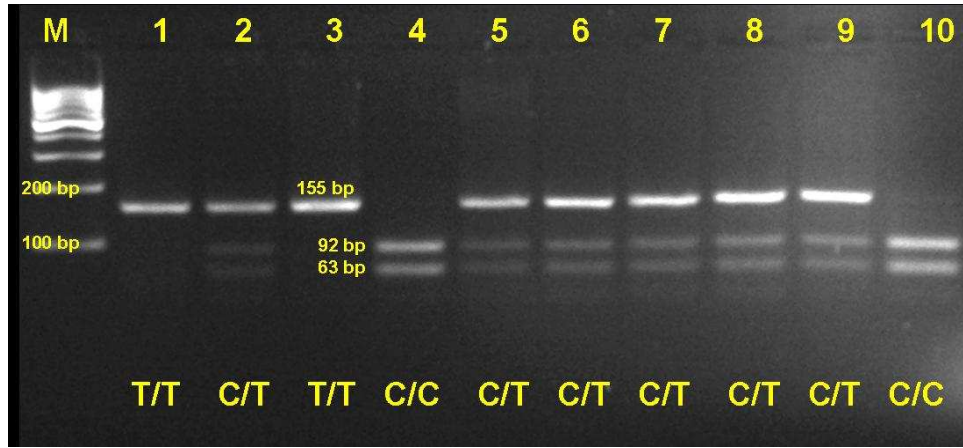
*: Maraş/Adana bölgesine ait hastalardan izole edilen *H.pylori* suşları

Mide biyopsi örneklerinde en sık tespit edilen *IL-1B* 511 ve 31 kombinasyonu sırayla CT/CT (45), CC/TT (34) olarak belirlendi (Tablo 15). Şekil 10’da *IL-1B* -511 polimorfizmine ait 155 bp uzunluğundaki amplikonun (*IL-1B*-511 C/T polimorfizmi) *AvaI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi elde edilen DNA fragmanlarının % 2,5’lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü görülmektedir. Şekil 11’da *IL-1B* -31 polimorfizmine ait 239 bp uzunluğundaki amplikonun *AluI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile elde edilen DNA fragmanlarının % 2,5’lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü görülmektedir. Şekil 12’de *IL1-RN* allelik polimorfizm, 86 bp’lik ardışık tekrar eden dizilerin PCR-VNTR ile elde edilen DNA fragmanlarının % 2’lik agaroz jelde UV ışığı altındaki görüntüsü görülmektedir.

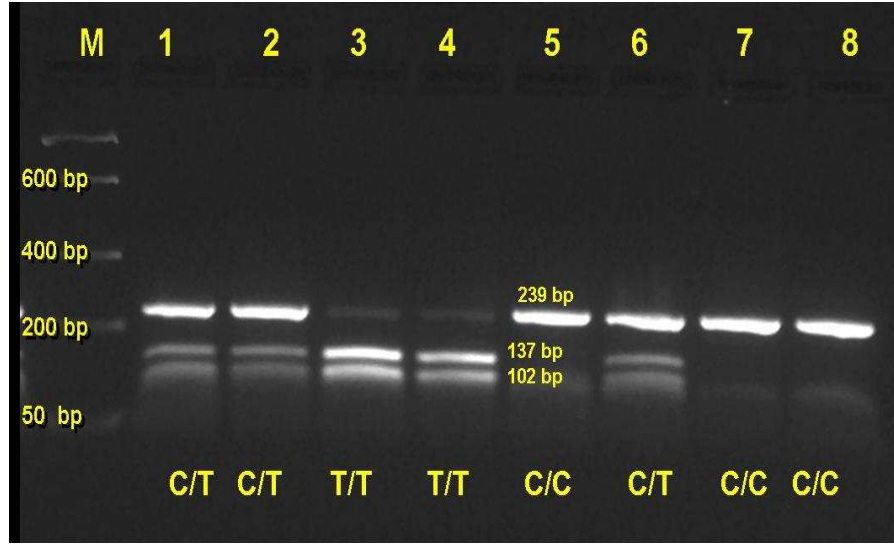
Tablo 15: Mide biyopsi örneklerinde en sık tespit edilen *IL-1B* 511 ve 31 kombinasyonları*

		-511 allelik polimorfizm			Toplam
		CT allel	CC allel	TT allel	
-31 allelik polimorfizm	CT allel	45	6	4	55
	CC allel	7	0	13	20
	TT allel	1	34	0	35
Total		53	40	17	110

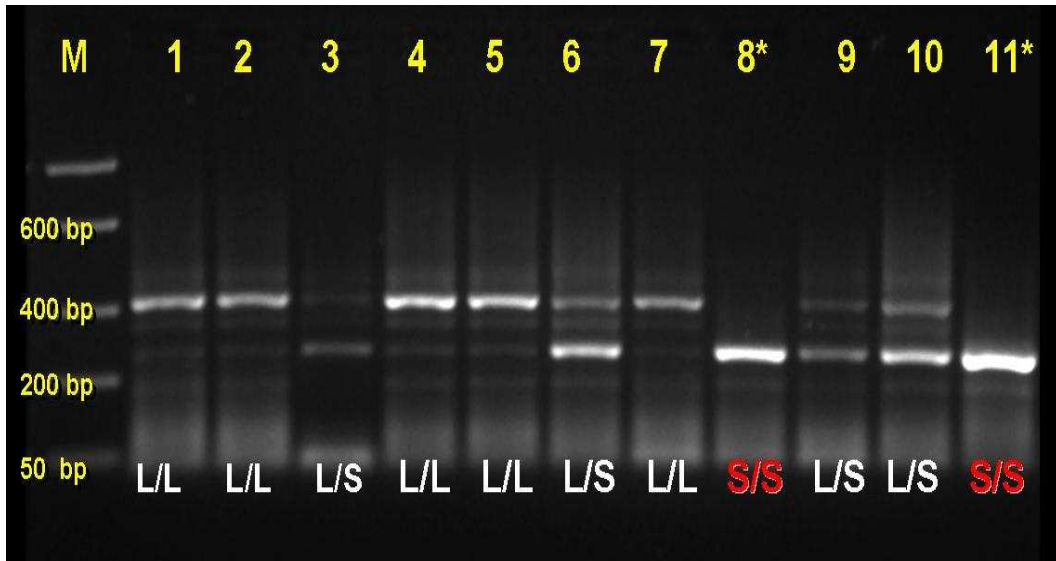
*: Maraş/Adana bölgesine ait hastalar, mide biyopsi örnekleri



Şekil 10: *IL-1B* -511 polimorfizmi, 155 bp uzunluğundaki amplikonun (*IL-1B* -511 C/T polimorfizmi) *Ava*I restriksiyon enzimi ile kesilmesi elde edilen DNA fragmanlarının % 2,5'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü (M: 100 bp'lik marker, 1-10: Hasta örnekleri)



Şekil 11: *IL-1B* -31 polimorfizmi, 239 bp uzunluğundaki ampliconun AluI restriksiyon enzimi ile kesilmesi ile elde edilen DNA fragmanlarının % 2,5'lik agaroz jel elektroforezinde UV ışığı altındaki görüntüsü (M: 200 bp'lik marker,1-8: Hasta örnekleri)



Şekil 12: *IL-1RN* allelik polimorfizm, 86 bp'lik ardışık tekrar eden dizilerin PCR-VNTR ile elde edilen DNA fragmanlarının % 2'lik agaroz jelde UV ışığı altındaki görüntüsü. (M: 200 bp'lik marker, 1-11: Hasta örnekleri, L: uzun tekrar, S: kısa tekrar)

4.2. Hasta grubun (Gaziantep) demografik verileri ve elde edilen diğer parametreler

Antep hasta grubunda çeşitli gastroduodenal patolojilere sahip yaş ortalaması 41,5 ($\pm 14,5$) olan 44'ü (% 48,4) erkek, 47'si (% 51,6) kadın 91 hasta değerlendirmeye alındı (Tablo 16). *H.pylori* pozitif olan 91 örneğin 50'si (% 54,9) *cagA* pozitif, 78 i (% 85,7) *vacA* pozitif olarak bulundu. Tip I genotipe (*cagA+*,*vacA+*) sahip suşlar % 54,9 (50) oranında tespit edildi (Tablo 17).

Tablo 16: 1. Gaziantep hasta grubunun demografik özellikleri, cinsiyete göre yaş grupları ve endoskopik bulgular.

		Yaş grupları		41,5 (± 14,5)		n(%)		Endoskopik bulgular		
		18-30	31-41	41-50	51-75	Toplam	Gastrit	Ülser	Toplam	
H.pylori PCR										
Pozitif	Erkek	12	9	11	12	44	36	8	44	
	Kadın	10	11	14	12	47	40	7	47	
Toplam		22(24,2)	20(21,9)	25(27,8)	24(26,4)	91	76	15	91	

Tablo 17: *H.pylori* pozitif olduğu belirlenen Gaziantep bölgesine ait örneklerde *H.pylori* suşlarının cinsiyete göre genotip dağılım oranları.

	<i>cagA</i> n(%)		<i>vacA</i> n(%)		Tip1 genotip n(%)		Tip2 Genotip n(%)	
	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif				
Cinsiyet								
Erkek	18	26	3	41	26		18	
Kadın	23	24	10	37	24		23	
Toplam	41(45,1)	50(54,9)	13(14,3)	78(85,7)	50(54,9)		41(45,1)	

Gaziantep mide biyopsi örneklerinde konak doku polimorfizmini tespit etmek amacıyla yapılan IL-1 β polimorfizm analizinde -511'de 54 (% 59,3) hastada CT, 17 (% 18,7) hastada CC ve 20 (% 22) hastada TT polimorfizmi tespit edilirken IL-1B -31 de 56 (% 61,5) hastada CT, 18 (% 19,8) hastada CC ve 17 (18,7) hastada TT polimorfizmi tespit edildi. Kahramanmaraş grubundan daha yüksek bir oran olarak *IL-1 RN* polimorfizm analizinde 16 (% 17,6) hastada S/S alleli tespit edildi. Tablo 18'de *IL-1* polimorfizm durumunun cinsiyete göre dağılım oranları görülmektedir. Mide biyopsi

örneklerinde en sık tespit edilen IL-1 511 ve 31 kombinasyonu sırayla CT/CT (54), TT/CC (18) olarak belirlendi (Tablo 19).

Tablo 18: Gaziantep örneklerinde IL-1 polimorfizminin cinsiyete göre dağılım oranları.

Polimorfizm	IL-1B-31 n (%)			IL-1B-511 n (%)			IL-1 RN n (%)			Toplam n (%)
	CT	CC	TT	CT	CC	TT	S/S	L/S	L/L	
Cinsiyet										
Erkek	24	10	10	24	10	10	9	20	15	44 (48,4)
Kadın	32	8	7	30	7	10	7	22	18	47 (51,6)
Toplam	56 (61,5)	18 (19,8)	17 (18,7)	54 (59,3)	17 (18,7)	20 (22,0)	16 (17,6)	42 (46,2)	33 (36,3)	90

Tablo 19: Gaziantep mide biyopsi örneklerinde en sık tespit edilen IL-1 511 ve 31 polimorfizm kombinasyonları,

		-511 allelik polimorfizm n (%)			Toplam n (%)
		CT allel	CC allel	TT allel	
-31 allelik polimorfizm	CT allel	54	0	2	56 (61,5)
	CC allel	0	0	18	18 (19,8)
	TT allel	0	17	0	17 (18,7)
Total		54 (59,3)	17 (18,7)	20 (22,0)	91

3. Kontrol grubunun demografik verileri ve elde edilen diğer parametreler:

Kontrol kan grubunda 63'ü erkek (% 70,0), 27'si kadın (% 30,0), yaş ortalaması 31,4 ($\pm 5,8$) olan herhangi gastrointestinal şikayetleri olmayan sağlıklı 90 kişinin periferik kan örneği çalışıldı. Tespit edilen polimorfizm oranları ve kontrol grubuna ait demografik veriler tabloda 20 ve 21'de özetlenmiştir. Kontrol kan grubu örneklerinde *IL-1B* polimorfizm analizinde -511 ve -31 bölgelerinde en sık belirlenen polimorfizm CT olarak tespit edilirken *IL-1 RN* allelik polimorfizmde S/S alleli her iki hasta grubundan oldukça düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 20: Kontrol kan grubu örneklerinde IL-1 polimorfizm prevelanslarının cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı.

Polimorfizm	IL-1B-31 n(%)			IL-1B-511 n(%)			IL-1 RA n(%)			
Toplam	CT	CC	TT	CT	CC	TT	S/S	L/S	L/L	Toplam
Cinsiyet										
Erkek	43	10	10	45	10	8	2	27	34	63 (% 70)
Kadın	15	5	7	16	6	5	0	7	20	27 (% 30)
Yaş grupları										
20-30	24	5	6	25	6	4	1	10	24	35
31-40	30	10	8	32	7	9	1	22	25	48
41-50	4	0	3	4	3	0	0	2	5	7
Toplam	58	1	17	61	16	13	2	34	54	90

Tablo 21: Kontrol kan grubu örneklerinde tespit edilen IL-1 polimorfizm kombinasyon insidansları.

Polimorfizm	IL-1 RN n(%)			511			Toplam
	S/S	L/S	L/L	CT	CC	TT	
-31							
CT	0	23	35	58	0	0	58
CC	1	6	8	2	0	13	15
TT	1	5	11	1	16	0	17
Toplam	2	34	54	61	16	13	90
-511							
CT	0	24	37	-	-	-	61
CC	1	5	10	-	-	-	16
TT	1	5	7	-	-	-	13
Toplam	2	34	54	-	-	-	90

4. Risk analiz sonuçları.

Elde edilen moleküler verilerin OR (odds ratio) oranları hesaplanarak risk analizi tabloları oluşturuldu (Tablo 22 ve Tablo 23). Bakteriye ve konağa ait verilerin ülser ve gastrit patolojilerine etkisi ve OR oranları karşılaştırıldı (Tablo 22). Ülser ve gastritli hastalarda *H.pylori*'nin sıklığı, *vacA* gen bölgesi taşıyıcılığı, *cagA* gen bölgesi taşıyıcılığı ve bakteri genotipinin risk üzerine bir etkisi olmadığı, ülserli ve gastritli hastalardan elde edilen oranlardaki farkın istatistikî olarak anlamlı olmadığı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Tip1 suşlar gastrit ve ülserde daha sık oranda görülmektedir. Ülserli ve gastritli hasta grupları arasında *IL-1 β -31* polimorfizmi (*CT*, *CC*, *TT*) ve *IL-1 β -31* bölgesinde C taşıyıcılığı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır fakat T taşıyıcılığı açısından iki grup arasında elde edilen veriler arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,032$) ve T- taşıyıcılığın gastrit riskini 0.89 kat azalttığı tespit edilmiştir (OR (% 95GA): 0,89 (0,84-0,94)). Yine ülserli ve gastritli hastalar

arasında *IL-1 β -511* polimorfizmi (*CT*, *CC* ve *TT*) ve *IL-1 β -511* bölgesinde C taşıyıcılığı, T taşıyıcılığı, *IL-1 RN* polimorfizm durumu (*SS*, *LS* ve *LL*), *IL-1RN S* allel taşıyıcılığı açısından anlamlı bir fark bulunamamış, fakat *IL-1RN L* allel taşıyıcılığı açısından iki grup arasında elde edilen fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,03$) ve L allel taşıyıcılığı gastrit riskini 0,30 kat azaltmaktadır (OR (% 95GA): 0,30(0,097-0,94)).

Konağa ait *IL-1* polimorfizmi verilerinin hasta ve kontrol grubuna kıyaslanması ile elde edilen risk oranları Tablo 23’de özetlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasındaki *IL-1 RN* alleleri (*SS*, *LS*, *LL*), *IL-1 RN L* allel taşıyıcılığı ve *IL-1 RN S* allel taşıyıcılığı için elde edilen oranlar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ek olarak *IL-1 RN L* allel taşıyıcılığı gastrik patoloji riskini 0,168 kat azaltmaktadır (OR (% 95GA): 0,168(0,039-0,725)) ve *IL-1 RN S* allel taşıyıcılığı ise gastrik patoloji riskini 1,813 kat artırmaktadır. (OR (% 95GA): 1,813(1,094-3,00)). Bununla birlikte hasta ve kontrol grubu arasında *IL-1 β -511* polimorfizmi (*CT*, *CC* ve *TT*) ve *IL-1 β -511* bölgesinde C taşıyıcılığı, T taşıyıcılığı, *IL-1 β -31* polimorfizmi (*CT*, *CC* ve *TT*) ve *IL-1 β -31* bölgesinde C taşıyıcılığı, T taşıyıcılığı, açısından anlamlı bir fark bulunamamış ve gastrik patoloji gelişme riski üzerine etkili olmadıkları bulunmuştur.

Tablo 22. Çalışmaya dahil edilen tüm hasta gruplarında gastrit ve ülser patolojileri için risk analizi ve istatistiksel sonuçlar.

	Ülser n (%)	Gastrit n (%)	OR n (%95 GA) P*	Toplam Hasta n (%)
Cinsiyet				
Erkek	10 (55,6)	57 (31,1)	2,8(1,0-7,4)	67
Kadın	8 (44,4)	126 (68,9)	0,036	134
H.pylori PCR				
Pozitif	16(88,9)	163(89,1)	0,98(0,21-4,58)	179(89,1)
Negatif	2(11,1)	20(10,9)	0,981	22(10,9)
vacA gen bölgesi				
Pozitif	13 (81,3)	152 (92,1)	0,37(0,93-1,47)	165 (91,2)
Negatif	3(18,8)	13(7,9)	0,14	16 (8,8)
cagA gen bölgesi				
Pozitif	10(62,5)	97(58,8)	1,17(0,41-3,37)	107(59,1)
Negatif	6(37,5)	68(41,2)	0,773	74(40,9)
H.pylori genotip				
Tip1	10(62,5)	97(58,8)	1,1 (0,41-3,37)	107(59,1)
Tip2	6(37,5)	68(41,2)	0,773	74(40,9)
IL-1 β -31 polimorfizmi				
CT allel	14(77,8)	97(53,0)		111(55,2)
CC allel	0	38(20,8)	0,059	38(18,9)
TT allel	4(22,2)	48(26,2)		52(25,9)
C taşıyıcılığı				
C taşıyan (CC, CT)	14 (77,8)	135(73,8)	1,24(0,39-3,97)	149(74,1)
C taşımayan (TT)	4(22,2)	48(26,2)	0,711	52(25,9)
T taşıyıcılığı				
T taşıyan (CT, TT)	18(100)	145(79,2)	0,89(0,84-0,94)	163(81,1)
T taşımayan (CC)	0	38 (20,8)	0,032	38 (18,9)
IL-1 β -511 polimorfizmi				
CT allel	12(66,7)	95(51,9)		107(53,2)
CC allel	4(22,2)	53(29,0)	0,47	57(28,4)
TT allel	2(11,1)	35(19,1)		37(18,4)
C taşıyıcılığı				
C taşıyan (CC, CT)	16(88,9)	148(80,9)	1,89(0,42-8,61)	164(81,6)
C taşımayan (TT)	2(11,1)	35(19,1)	0,40	37(18,4)
T taşıyıcılığı				
T taşıyan (CT, TT)	14(77,8)	130(71,0)	1,43(0,45-4,53)	144(71,6)
T taşımayan (CC)	4(22,2)	53(29,0)	0,545	57(28,4)
IL-1 RN polimorfizmi				
SS (2-2)	5(27,8)	19(10,4)		24(11,9)
LS (1,3,4,5-2)	5(27,8)	81(44,3)		86(42,8)
LL (1,3,4,5-1,3,4,5)	8(44,4)	83(45,4)	0,074	91(45,3)
S taşıyıcılığı				
S taşıyan (SS, LS)	10(55,6)	100(54,6)	1,04(0,39-2,75)	110(54,7)
S taşımayan (LL)	8(44,4)	83(45,4)	0,941	91(45,3)
L taşıyıcılığı				
L taşıyan (LL, LS)	13(72,2)	164(89,6)	0,30 (0,097-0,94)	177(88,19)
L taşımayan (SS)	5(27,8)	19(10,4)	0,03	24(11,9)

* Pearson Chi-Square, OR: Odds ratio, n: Sayı, GA: Güven Aralığı.

Tablo 23. Kontrol ve hasta grupları için risk analizi ve istatistiksel sonuçlar.

	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	OR (%95 GA) P*	Toplam n (%)
IL1 RN				
SS	24(11,9)	2(2,2)		26(8,9)
LS	86(42,8)	34(37,8)	0,008	120(41,2)
LL	91(45,3)	54(60,0)		145(49,8)
IL1 RN				
L taşımak (LL+LS)	177(88,1)	88(97,8)	0,168(0,039-0,725)	265(91,1)
L taşımamak (SS)	24(11,9)	2(2,2)	0,007	26(8,9)
IL1 RN				
S taşımak (SS+LS)	110(54,7)	36(40,0)	1,813(1,094-3,00)	146(50,2)
S taşımamak (LL)	91(45,3)	54(60,0)	0,02	145(49,8)
IL-1 31				
CT	111(55,2)	58(64,4)		169(58,1)
CC	38(18,9)	15(16,7)	0,307	53(18,2)
TT	52(25,9)	17(18,9)		69(23,7)
IL-1 31 C taşıyıcılığı				
C taşıyan (CC, CT)	149(74,1)	73(81,1)	0,667(0,36-1,23)	222(76,3)
C taşımayan (TT)	52(25,9)	17(18,9)	0,196	69(23,7)
IL-1 31 T taşıyıcılığı				
T taşıyan (TT, CT)	163(81,1)	75(83,3)	0,858 (0,45-1,66)	238(81,8)
T taşımayan (CC)	38(18,9)	15(16,7)	0,647	53(18,2)
IL-1 511				
CT	107(53,2)	61(67,8)		168(57,7)
CC	57(28,4)	16(17,8)	0,060	73(25,1)
TT	37(18,4)	13(14,4)		50(17,2)
IL-1 511 C taşıyıcılığı				
C taşıyan (CC, CT)	164(81,6)	77(85,6)	0,748(0,376-1,488)	241(82,8)
C taşımayan (TT)	37(18,4)	13(14,4)	0,407	50(17,2)
IL-1 511 T taşıyıcılığı				
T taşıyan (TT, CT)	144(71,6)	74(82,2)	0,546(0,29-1,02)	218(74,9)
T taşımayan (CC)	57(28,4)	16(17,8)	0,054	73(25,1)

* Pearson Chi-Square, OR: Odds ratio, n: Sayı, GA: Güven Aralığı.

5. TARTIŞMA

Helicobacter pylori ile enfekte kişilerin % 10-15'inde semptomatik enfeksiyon oluştururken, bu olguların % 2-4'ünde gastroduodenal patoloji seyrini değiştirerek başta adenomatöz kanserler olmak üzere çeşitli mide kanseri ile sonlanmaktadır.^{221,241-243} Bununla birlikte enfekte kişilerin çoğu (% 80–90) bakteriyi hastalığın herhangi bir semptomu olmadan taşımakta ve bulaştırmaktadır. Özellikle erken çocukluk döneminde elde edilen *H.pylori* enfeksiyonu uygun etmenler varlığı altında kronik dönemde MALT lenfoma ve mide kanseri riskini artırması nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1994 yılında *H.pylori*'yi Tip I karsinojen olarak sınıflandırmıştır.

Günümüzde *H.pylori* enfeksiyonunun tanısında ve prognozun izlenmesinde birçok invazif ve non-invazif test yöntemi geliştirilmiştir.²⁴⁴ Klinik materyallerden *H.pylori*'nin tespitinde histolojik incelemenin sensitivitesinin nispeten düşük oluşu, kültürde izolasyon yönteminin de bakterinin üreme özelliklerinde kaynaklanan ve tecrübeli laboratuarlarda bile % 50-80 oranında kaydedilen sensitivite düşüklüğü ile sonuçların uzun sürede alınması gibi dezavantajları tanıda altın standart olarak kabul edilen bu yöntemlerin rutin tanıda kullanım alanını sınırlandırmaktadır. Diğer taraftan *H. pylori* seroprevelans çalışmalarında sıklıkla kullanılan özgül IgG'nin araştırılmasının geçmiş ve şuan ki aktif enfeksiyonu birbirinden ayırt edememe gibi bir dezavantajı vardır. Enfeksiyon çözülünce sıklıkla IgG antikorları negative dönmektedir ve sıklığı ve süresi popülasyonlar arasında oldukça değişkendir.²⁵⁴ Ek olarak okul öncesi çocuklarda seronegatiflik diğer yöntemlerle de gösterildiği gibi yaygındır.²⁵⁵

Son yıllarda tanısında güçlük çekilen birçok bakteriyel ve viral enfeksiyonun tanısında olduğu gibi *H.pylori* enfeksiyonlarının tanısı ile aynı zamanda bakteriye ait *vacA*, *cagA* ve *iceA* gibi virulans genleri ve antibiyotik direncine yol açan mutasyonların tespitinde PCR bazlı moleküler yöntemler başarı ile uygulanmaya başlamıştır. Gastrik biyopsi materyali ve gastrik sıvı gibi klinik materyalde *H.pylori* tanısı için bakteriye ait çeşitli gen bölgelerini hedef alan, farklı klinik materyali örnek olarak kullanabilen

oldukça yüksek sensitivite ve spesivitede PCR protokolleri geliştirilmiş, bu yöntemler sadece tanı amaçlı değil epidemiyolojik amaçlı veya virulans ile direnç genlerinin eş zamanlı olarak tanısı amacı ile de kullanılmıştır.²⁴⁵⁻²⁴⁷ Mesela Hindistanda bir çalışmada tükürük ve dışkı örneklerinin analizinde PCR yöntemi kullanılmış,²⁵⁶ ve çalışma PCR bazlı yorumlamaların pahalı ve DNA izolasyonlarından kaynaklanan bazı dezavantajları olduğu gösterilmiştir.^{254,257} Bildirilen prevelanslar Japonyada çocuklarda % 4 iken Avustralya'daki Afrikalı mültecilerde bu oran % 82'lere ulaşmaktadır.²⁵⁹⁻²⁶⁰ Avustralya laboratuvar örneklerinde, Malezya kan bağışçılarında ve Çin ve Japon okul çağı çocuklarda yapılan araştırmalarda prevelans % 15 veya daha az olarak bildirilmiştir.^{257,261-263} İsrailli çocuk bakım merkezlerinde ise % 24-25 oranında prevelans tespit edilmiştir.²⁶⁴ İtalya kırsal kesimlerinde (ortalama yaş= 59), prevelans % 58 olarak bulunurken kuzey İsveç'te benzer bir çalışmada (ortalama yaş= 52) anlamlı olarak % 34 gibi oldukça düşük oranlarda tespit edilmiştir.²⁶⁵ Ülkemizin de aralarında bulunduğu Mısır, İran, Arnavutluk ve Çin'de ise prevelans % 60 veya daha fazla olarak bildirilmiştir.²⁶⁶

Yeni başlayan *H.pylori* infeksiyonları veya reinfeksiyonu başlaması ile ilgili olarak sadece üç çalışma yapılmıştır. Bagledeş'de yapılan çalışmada yaşları yenidoğan ve 2 yaş arasında değişen 258 çocuk değerlendirilmiştir.²⁶⁶ Çalışmada 6 aylık çocuklarda çok az sıklıkta (IgG, IgA ve/veya SAT ile % 15'den daha az) enfeksiyon delili bulunurken, SAT ile 2 yaş civarı pozitiflik % 49, IgG ve/veya IgA ile % 60 oranında pozitiflik bildirmişlerdir. Japonya'da enfeksiyonun edinilme ve kaybolma noktalarının değerlendirildiği 452 çocukta idrar testi yapılmıştır.²⁶⁰ Bu çalışmada 12 aylık insidansın yaşla birlikte azaldığını, 4 yaş civarı % 2,6, 7 yaş civarı % 1,3 ve 10 yaş civarı % 0,65 olarak tespit edilirken enfeksiyonun kaybolma oranlarını ise 4-, 7- ve 10- yaş gruplarında sırayla % 1,3, % 2, ve 0 olarak tespit etmişlerdir. İsrail'li dispeptik yakınmaları olan, negatif *H.pylori* testi olan erişkinlerde yapılan başka bir çalışmada yıllık insidansı % 0,55 ve % 0,37 olarak bildirilmiştir.²⁶⁸

Ülkemizde *H.pylori*'nin gastroduodenal sistem kolonizasyon oranı gelişmekte olan ülkelere uymakla birlikte kolonizasyon asemptomatik gruplarda % 50'nin üzerinde, semptomatik gruplarda ise % 75-86 gibi yüksek oranlara ulaşmaktadır.^{269,270} Ancak ülkemizde özellikle çocukluk dönemine ait epidemiyolojik veriler daha çok serolojik testlerle elde edilmiş sonuçlara dayandırılmıştır. Mesela Arslan D. ve

arkadaşlarının çocuklardaki *H.pylori* seroprevalansının belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada 221 pediatrik hastanın 129'unu (% 58,4) seropozitif olarak tespit etmişlerdir.²⁷¹ Yücel ve arkadaşları da yine aynı yöntemi kullanarak yaptıkları araştırmada genç erişkinlerde prevalansı % 24 olarak tespit etmişlerdir.²⁷² Ülkemizde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde yaşla artış göstererek 12 yaş üzerinde % 50-70 arasında rapor edilmektedir.^{274,275} Nitekim çeşitli toplumlarda antikör pozitifliği sıklığının sosyoekonomik düzeyle ilişkili olarak da farklılık göstermekle birlikte yaşa paralel olarak da arttığı gösterilmiştir. Mesela Hindistan'da 20'li yaşlarda % 80 pozitiflik tespit edilirken İtalya'da % 29, Fransa'da 10-19 yaş grubunda % 16 bulunmuştur.²⁷³ Yine birçok çalışmada *H.pylori* sıklığının yaşla artış gösterdiği konusunda fikir birliği vardır. Ertem ve arkadaşlarının üre nefes testi ile yaptıkları çalışmada enfeksiyon oranı 3-12 yaş arasında %4 9,5; 11-12 yaşta % 71,4 olarak bulunmuştur.²⁷⁶ Bu oran serolojik olarak yapılan diğer çalışmalarla benzerdir. Ülkemizde moleküler yöntemlerin epidemiyolojik amaçlı olarak kullanıldığı büyük olgu serilerini içeren çalışmalara ait sonuçlar az sayıdadır.

Biz, *H.pylori* ile gastroduodenal patoloji arasındaki muhtemel ilişkiyi, bu ilişkide rol oynayan bakteri ve konağa ait bilinen virulans genleri ve genlerdeki allelik polimorfizmi tespit amacı ile moleküler bazlı yöntemleri kullandığımız bu çalışmada gastrik biyopsi örneklerinden *H.pylori* DNA izolasyonu için optimizasyonu oldukça iyi olan QIAgen doku ekstraksiyon kitlerini kullanmayı tercih ettik. PCR ile ön tanı için için de diğer primer çiftlerine göre bakteriyi daha yüksek oranda tespit eden daha spesifik ve konservatif olan *glmM* genini hedef alan primerleri kullandık (Tablo 9).^{248,250}

Çalışmamızın ilk hedefi semptomatik kişilerin mide mukozasında *H.pylori* kolonizasyonu sıklığını belirlemektir. Bu amaçla değerlendirilmeye alınan ve yaş ortalaması 46 olup, çoğunluğunda endoskopik olarak, antral gastrit, bulbit ve pangastrit tanısı konmuş olan, semptomatik 110 hastaya ait antrum ve/veya korpus örneklerinden 89 (% 80,9)'ünde *glmM* genini hedef dizilerinin varlığını PCR ile gösterdik. Bu oran gelişmekte olan ülke verileri ile büyük ölçüde benzerlik göstermiştir.

Diğer taraftan klinik patolojinin düzeyi ile bakteriye ait varsayılan virulans genleri arasındaki ilişkiyi tespit amacı ile de; *H.pylori vacA* ve *cagA* genleri ile *vacA* genindeki polimorfizmi araştırdık.

Virulans için en önemli bakteriyel faktör olarak tanımlanan *cagA* gen taşıyıcılığı ülkeler ve hatta bölgeler arasında izole edilen *H.pylori* suşları arasında farklı oranlar segilemektedir. Örneğin Almanya’da % 72, Hollanda’da % 67, Sri Lanka’da % 48, ABD’de, % 81, Nijerya’da % 93 ve Kore’de % 97 oranlarında bildirilmiştir.²⁸¹ Batı izolatlarının yarısından fazlasında *cagPAI* taşııcılığı gözlenirken zıt olarak hemen hemen tüm Doğu Asya suşlarının *cagPAI* genlerini taşıdıkları gösterilmiştir.²⁸² Avrupa ve Amerika’yı da kapsayan Batı popülasyonlarından izole edilen *H.pylori* suşlarının yaklaşık % 60-70’inde *cagA* geni taşıdıkları tespit edilmiştir.^{283,284} Yine benzer şekilde Kim SY ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada Doğu Asya ülkelerinde *cagA* pozitif *H.pylori* oranı % 90’dan fazla olarak bildirmişlerdir.²⁸⁵ Brezilya’da Ashour AAR ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmanın sonunda, DÜ’li hastalarda *cagA* pozitifliği % 88 oranında bildirilmiştir.²⁸⁶ Bagledeş’te yapılan 90 serum örneğinin Western Blot ile analizinde örneklerin 48 (% 53,3)’inde Tip1 suşlara karşı antikorlar gösterilmiştir.²⁸⁷ Bindayna K ve arkadaşlarının PCR ile biyopsi, klinik izolat ve fekal örneklerde *cagA* gen varlığını araştırmışlar ve biyopsi örneklerinin 59 (% 59)’unda, klinik örneklerin 10 (% 62)’unda ve fekal örneklerin 10 (% 22,7)’unda gen varlığını tespit etmişlerdir.²⁸⁸ DÜ’li hastaları (% 80) diğer endoskopik bulguları olan hastalarla (% 42) kıyasladığında DÜ’li hastalarda anlamlı oranda yüksek tespit etmişlerdir. Yazarlar, PCR yönteminiyle biyopsi örneklerinden *cagA* varlığı tespit edilmesinin ve güvenilir bir teknik olduğunu vurgularlarken dışkı örneklerinin kullanılmasının düşük sensitivite gösterdiğine dikkati çekmişlerdir.²⁸⁸

Ülkemizde *cagA* gen prevalansı % 59-78 arasında değiştiği bilinmektedir.²⁹¹ Kantarçeken ve arkadaşlarının 2003 yılında yetişkin popülasyonda yaptıkları çalışmada hastaların % 75,4’ünde (107/142) *H.pylori* izole etmişler ve bu 107 hastanın 66’sında (% 61,7) *cagA* gen varlığını göstermişlerdir. Çalışmada *cagA* geninin DÜ ve MÜ ile pozitif ilişkilerinin olduğunu ($P<0.01$, $P<0.02$) fakat NÜD ile bir ilişkilerinin olmadığını bildirmişlerdir.²⁸⁹

Salih ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise PCR ile *H. pylori* suşlarında *cagA* genini gastritli hastaların % 57,1’inde ve peptik ülserli hastaların ise % 92,9’unda tespit etmişlerdir.²⁹⁰ Sarıbaşak H ve ark. 92 biyopsi örneğini değerlendirdikleri çalışmalarında 65 örnekte *H.pylori* kolonizasyonu tespit etmişler, bu suşların da 51’inin (% 78) *cagA* pozitif olduğunu bildirmişlerdir.²⁹¹ Bolek BK ve

arkadaşları, sadece antrum örneklerini değerlendirdikleri çalışmalarında kolonize suşların; DÜ'li hastalarda % 87, MÜ'li hastalarda % 71, gastritli hastalarda ise % 57'sinin *cagA* pozitif olduğunu bildirmişlerdir.²⁹² Aydın F ve ark.178 ise *cagA*+ suşların prevalansının peptik ülserli hastalarda % 72, NÜD'li hastalarda ise % 44 olduğunu belirtmişlerdir.²⁹³

Yine bu oranla uyumlu olarak Erzin ve arkadaşları çalışmalarında % 73,6 sıklığında gen bölgesinin varlığını göstermişler ve bu oranın çoğunun DÜ ve gastrik kanserli hastalarda olduğunu belirlemişlerdir.²⁹⁴

Toğrul Nagiyev ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada 72'si (% 75,0) kadın ve 129'u (% 95,6) erkek hastalara ait olmak üzere 201 (% 87) hastanın biyopsi örneklerinden en az birisinde *H.pylori ureC* geni bulmuşlar ve *H.pylori* prevalansının G/MÜ'li hastalarda % 82,9, DÜ'li hastalarda da % 95,9 olduğunu belirlemişlerdir.²⁹⁵ Aynı çalışmada kolonize suşların % 84,1'inin *cagA*⁺*vacA*⁺ Tip-I suşlar olduğu, bu suşların G/MÜ'li ve DÜ'li kolonize hastalardaki prevalanslarının ise sırası ile % 78,6 ve % 94,3 olduğu bildirilmiştir.

Biz çalışmamızda endoskopik muayeneleriyle gastrit olarak tespit edilen Adana ve Kahramanmaraş hastalarında mide biyopsisinden izole ettiğimiz 89 *H.pylori* izolatının 57'si (% 64,0) *cagA* geni taşımakta olan Tip I genotipinde (*cagA*⁺,*vacA*⁺) suşlar olarak belirlerken 32'sinin (% 36,0) Tip II genotipine (*cagA*⁻ ve *vacA*^{+/-}) sahip olduğu belirledik. Bu oran Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

H.pylori virulans faktörleri ile ilgili olarak göstermeyi hedeflediğimiz 2. gen *vacA* geni oldu. Ökaryotik hücrelerde vakuolizasyon yapan sitotoksin, VacA'yı kodlayan *vacA* geni sinyal, s, (s1a-b-c, s2) ve orta, m, (m1, m2) bölgelerinde olmak üzere en az 2 değişken gen bölgelerine sahiptir.²⁹⁶ Genel olarak *s1m1* ve *s1m2* suşlarının yüksek ve orta düzeyde toksin ürettiği, buna karşın *s2/m2* suşlarının çok az veya hiç toksin üretmediği kabul edilmektedir ve çoğu *vacA* s1 suşların *cagA* pozitif olduğu ve markerların yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir. *vacA* s1 ve *cagA* pozitif genotipler istatiki olarak anlamlı düzeyde gastrik malignensi gibi ciddi klinik sonuçlarla ilişkilendirilmesinden sonra birçok popülasyonda bu genlerin allelik çeşitliği ile ilgili ileri analizler yapılmıştır.

Avrupa popülasyonunda dispeptik hastalardan izole edilen HP'de *vacA* geninin m bölgesini RFLP ile araştıran çalışmalarda *s1m2* genotipi % 40 olarak bulunurken

daha toksijenik genotip olan *s1m1* kombinasyonu % 40 oranında bulunmuştur.²⁹⁷ Yine *s1m2* genotipi, Kuzey Galler’de klaritromisine duyarlı ve dirençli tüm suşlar arasında en yaygın suş olarak bildirilmiştir.²⁹⁸ *m1c* alleli Doğu Asya’da sıklıkla tespit edilen alt allel tipi olarak bildirilmiştir.^{299,300}

Avrupa popülasyonunda *s1* allelinin *s1a* subtipiyle en sık tespit edilen genotip olarak belirlenmiştir, *s1a* ve *s1b* alleli Fransa ve İtalya da tespit edilirken İspanya ve Portekiz’de *s1b* subtipi tespit edilmiştir.³⁰¹ Yine Batı popülasyonunda *vacAs1* ve *cagA* varlığı DÜ ile anlamlı oranda ilişkili bulunmuştur.³⁰² Bununla birlikte Asya popülasyonunda yapılan çalışmalarda bu ilişki doğrulanmamış ve önemli coğrafik değişikliklerin var olduğu bildirilmiştir.^{303,304} Tomasini ML ve arkadaşları *cagA* pozitif *vacAs1c-m1* ve *iceA1* allelinin Japonya ve Kore’de predominant olduğu belirlenmiştir.³⁰⁵ Qiao ve arkadaşları Çin’in Xi’an bölgesinde *vacAs1* genotipini daha sık olduğunu bildirirlerken *m1* ve *m2* tiplerinin eşit olduğunu bildirmişlerdir.³⁰⁶

H.pylori suşlarının virulansına *vacA* geninin katkısı ile ilgili yapılan çalışmalarda bölgesel olarak değişen sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalarda, daha önce de belirtildiği gibi *s1m1* ve *s1m2* allellerine sahip suşların daha virulan olduğu, *s2m2* suşlarının daha hafif, kendini sınırlandıran klinik tablolara yol açtığı iddia edilmiştir.³⁰⁷ Ayrıca, *s1c* suşlarının Asya kökenli suşlarda daha yoğun görüldüğü ve bu bölgede daha sık karşılaşılan mide kanserleri ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüşse de, tek başına *s1c* ile kanser oluşumunun izah edilemeyeceği bu konudaki çelişkili sonuçlar üreten çalışmalarla gösterilmiştir.^{308,309} *s1a*, *s1b* ve *m1a* allellerinin Avrupa ve Güney Amerika suşlarında, *s1c* ve *m1b* allellerinin ise daha çok Doğu Asya kökenli suşlarda olduğu ortak görüşüne varılmıştır.^{310,311} *vacAs2* alleli Avrupa, Orta ve Kuzey Amerika ve Doğu Asya popülasyonlarında yapılan çalışmalarda % 30’dan daha az oranlarda tespit edilmiştir.³¹² Kuveyt’te yapılan başka bir çalışmada ise mide biyopsi izolatlarında *s1* ve *s2* allelleri eşit oranda bulunmuştur.³¹³ *s1* alleli Kuzey Amerika’da %65-100 arasında bulunurken Doğu Asya ve Japonya’da % 77 oranında bulunmuştur,³¹⁴ *vacA m1* alleli *m2*’den daha sık bir oranda (>% 80) Kuzey Amerika, Portekiz, İspanya ve Japonya’da tespit edilirken Çin’de *m2* allelinin orta bölgesi en sık belirlenen allellerdir.³¹⁴ İranda yapılan başka bir çalışmada ise *s1m2* kombinasyonunun peptik ülserle daha çok ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada gastrik biyopsi örnekleri PCR ile incelenmiş, *s1*

alleli *s2* allelinden daha sık oranda tespit edilirken, *s1m2* % 54, *s1/m1* kombinasyonu % 20,2, ve *s2m2* % 21,6 oranında ve en az sıklıkla *s2m2* genotipini bulmuşlardır.³¹⁵

Ülkemizde Salih, B.A. ve arkadaşlarının NUD'li hastalarda yaptıkları çalışmada *vacA-s1a-m1a* genotipini predominant olarak bulurlarken gastritli hastalarda *s2m2* genotipini en sık bulmuşlardır.³¹⁶ Erzin ve arkadaşları *vacA s1a* genotipini % 83,5 oranında bulmuşlar ve *vacA s1a*-pozitif suşların DÜ ve gastrik kanserle anlamlı olarak ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte hiçbir izolatta *vacA s1c* alt genotipini tespit etmemişlerdir. Bununla birlikte Erzin ve arkadaşları ile Aydın ve arkadaşları *m1* ve *m2* genotiplerini eşit oranda bulmuşlardır. Yine Aydın F ve arkadaşları, antral biyopsi örneklerinde izolatların % 88,8'ini *vacA s1* olarak tiplendirmişler ve bunların hepsinin subtip1a olarak belirlemişler ve en yaygın genotip kombinasyonunu *s1a/m1* olarak bildirmişlerdir.^{293, 294} Bolek BK ve ark. İstanbul bölgesinde yaptıkları ve DÜ'li ve MÜ'li hastalara ait biyopsi örneklerini *cagA* ve *vacA* yönünden değerlendirdikleri çalışmalarında, DÜ'li hastalarda kolonize olan Tip-I suşlardaki en sık tespit ettikleri *vacA* genotipinin örneklerin % 81'inde *s1m1*, %15'inde ise *s1m2* olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar MÜ'li hastalarda da % 60 ile *s1m1* kombinasyonunun en sık karşılaşılan genotip olduğunu, bunu % 40 ile *s1m2* genotipinin izlediğini tespit etmişlerdir.²⁹² Ülkemizde yapılmış diğer bir çalışmada Sarıbaşak H ve ark., yine İstanbul bölgesinde 73 hastaya ait biyopsi örneklerini değerlendirerek, bu örneklerin % 89'unda *H.pylori* kolonizasyonu tespit etmişler ve bu suşların da % 78'inin Tip-I suşlar olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar Tip-I suşlar içerisinde en sık görülen *vacA* allelinin *s1a/m1a* olduğunu bildirmişlerdir.²⁹¹ Toğrul Nagiyev ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada Tip-I suşlarda en sık karşılaşılan *vacA* allelik kombinasyonun 47 (% 27,8) suş ile *s1a/m1b*, Tip-II suşlarda ise 11 (% 36,7) suş ile *s1/m2* olduğu görüldü. Çalışmada özellikle, G/MÜ'li hastalara ait 59 (% 57,3) suşta *s1c* allelinin varlığı dikkate değerdir. Aynı çalışmada, *H.pylori* Tip-I suşları DÜ'li hastalarda G/MÜ'li hastalara göre istatistiki yönden anlamlı şekilde yüksek bulunmuş ve DÜ'li hastalarda kolonize olan suşlarda *s1a* alleleline, G/MÜ'li hastalarda ise *s1c* alleleline sahip Tip-I suşların prevalansı diğer allelik tiplerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulduklarını bildirmişlerdir.²⁹⁵

Bizim çalışmamızda *vacA s1, m2* genotipleri Kuzey ve Doğu Avrupa genotipleri gibi en sık tespit edilen genotipler olarak tespit edilmiştir. Adana ve Kahramanmaraş,

vacA s ve/veya *m* gen bölgesini taşıyan *H.pylori* oranı 86 (% 96,6) izolatta tespit edilirken hedeflenen *vacA* gen bölgesinin PCR ile 3 izolat da olmadığı tespit edildi (Şekil 8, Şekil 9, Tablo 11). Çalışmamızda suşların 51'i (% 57,30) daha virulan olarak bildirilen *vacAs1* gen bölgesine, 27'si (% 30,33) *vacAs2* gen bölgesine, 2'si (% 2,24) her iki *s* bölgesini de taşımakta idi. 9 suшта ise *vacA s* bölgesi yoktu. Suşların 31(% 34,83) i *vacAm1* gen bölgesine, 48'si (% 53,9) *vacAm2* gen bölgesine, 3'ü (%3.4) her iki *m* bölgesini de taşımakta idi. 7 suшта ise (% 7,9) *vacA m* bölgesi tespit edilmedi. *H.pylori* izolatlarında *vacA* allellerinden *vacA s1m2* kombinasyonu (25 suş) en sık tespit edilen subtip olarak belirlenirken bunu takiben sırayla *s1m1*(23 suş), *s2m2* (19 suş) *vacA* allel kombinasyonu tespit edildi. En nadir tespit edilen genotip kombinasyonu ise *s2m1* ile 6 suшта tespit edildi.

Gastroduodenal patolojilerin gelişiminde bir diğer önemli faktör ise konak doku polimorfizmidir. IL-1, IL-1RA ve IL-8 gibi çeşitli sitokinlerin seviyesinin ve bunları kodlayan genlerdeki allelik polimorfizmlerle *H.pylori* virulans markerlarının gastrik patolojideki etkileriyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır.³¹⁷ Gastrik mukozada sekrete edilen proinflamatuvar sitokin olan IL-1 ve TNF- α , *H.pylori* infeksiyonunda inflamatuvar cevabı başlatma ve güçlendirmede anahtar rol oynamaktadır. Kromozom 2q üzerindeki IL-1 gen kümesi üzerinde *IL-1B* (proinflamatuvar sitokin IL1 β 'yı kodlar), *IL-1RN* (reseptör antagnisti IL-1 RA'yı kodlar) bölgeleri bulunmaktadır. IL-1 β gastrik asitin potent bir inhibitörüdür ve *H.pylori* infesiyonunda gastrik alanda modülasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. *IL1B* gen bölgesinde transkripsiyonun başlangıç bölgesinde hepsi C>T baz transizyonunu sergileyen polimorfik alanlar (-511, -31) bildirilmiştir. Yine başka bir polimorfizm *ILRN* genin 2. intronunda 86 bp'lik pentaallellik değişik sayılarda ardışık olarak tekrar eden bölgelerle (VNTR) ortaya çıkmaktadır. Bahsedilen polimorfizmlerin *H.pylori*'ye inflamatuvar cevabı mukozal IL-1 β üretimini anlamlı derecede etkileyerek inflamasyon şiddeti üzerine etkilerinin olduğunu ve gastrik ülser ve malignensi ile ilişkili olabilecekleri bildirilmektedir.^{318,319} Bununla birlikte sıklıkla atrofik gastriti takiben olşan gastrik karsinogenezis multifaktöryel ve çok basamaklı bir süreçtir. Gastrik mukozada HP infeksiyonuna immün yanıtta proinflamatuvar sitokin IL-1 β ve antiinflamatuvar sitokin IL-1RA'nın gastrik asit sekresyonu ve inflamasyonun düzenlenmesine kilit rollere sahiptir.³²⁰ *IL-1B-31*C* veya -511*T ve *IL-1RN*2/*2* genotipine sahip bireylerin *H.pylori* infeksiyonuna

cevap olarak hipoklorhidri ve gastrik atrofi geliştirme risklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu riskin aynı zamanda daha az proinflamatuar genotipe sahip olan bireylerle kıyaslandığında gastrik kansere yol açma olasılığını 2-3 kat artırdığı bulunmuştur.^{321,322} Ek olarak proinflamatuar IL-1 genotiplerin (*IL-1B-31C* veya -511*T ve *IL-1RN*2/*2*) hem intestinal hem de diffüz tip gastrik kanser riskini artırdığı fakat sıklıkla malignensi riskinin non-kardia bölgesiyle sınırlı olduğu bildirilmektedir.³²² Figueiredo C ve arkadaşları *IL-1B-511 T* allele ve *IL-1RN*2* homozygous taşıyıcıları, *vacAs1*, *vacAm1*, ve *cagA* pozitif suşla enfekte olduklarında gastrik kanser gelişme riskinin en üst seviyelere çıktığını iddia etmişlerdir.³¹⁷ Ek olarak, Rad ve ark.³²³ atrofik gastrit ve intestinal metaplazinin enyüksek prevalansa *IL-1B-511T* ve *IL-1RN*2* allelelerine sahip konağın *cagA* ve *vacA s1* pozitif suşla enfekte olduğunda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Sicinschi ve ark.³²⁴ *IL-1B-31* gen polimorfizminin *IL-1B-511* ile hemen hemen tam bir LD (linkage disequilibrium)'a sahip olduğu ve *cagA* statüsü ile *IL-1B-31* gen polimorfizminin intestinal tip gastrik kanser gelişiminde ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Fakat Machado ve ark.³²⁵, Chen ve ark.,³²⁶ ve Ruzzo ve ark.,³²⁷ *IL-1RN*2* allelinin ki bu allelin daha yüksek seviyelerde IL-1β sekresyonuyla ilişkili olduğu bilinmektedir, intestinal tipte gastrik kanserle artmış bir riskle ilişkili olduklarını vurgulamakla beraber sitokin gen polimorfizmlerinin ve gastrik kanserin histolojik tiplerinin her hangibir ilişkilerinin olmadığını bildirmişlerdir.

IL-1 gen küme polimorfizmi ile gastrik kanser ve prekürsörleri arasında ki ilişki Beyaz, Asyalı ve Latin Amerikan popülasyonları içeren gruplarda birbirlerinden bağımsız olarak yapılan çalışmalarla desteklenmiştir.³²⁸⁻³³⁰ Örneğin Hivana ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *IL-1RN*2* polimorfizmini gastrik mukozada yüksek derecede inflamasyon ve nötrofilik aktiviteyle birlikte gastrik ülser ve gastrik adeno karsinomlu hastalarda yüksek prevalansta bulmuşlardır.³³¹ Machado ve arkadaşları proinflamatuar IL-1 genotipleri ve *H.pylori*'ye ait bakteriyel virulans faktörlerinin (*cagA* pozitif, *vacA s1* ve *m1* pozitif) gastrik patoloji gelişimi üzerine kombine etkilerini rapor etmişlerdir.³³² Bununla beraber duodenal ülserli ve gastrik kanserli hastalarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *IL1B* polimorfizminin farklı popülasyonlarda değiştiğini göstermektedir. Örneğin İtalya'da yapılan D. Palli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gastrik kanser ile *IL1RN* and the *IL1B-31* polimorfizmi arasında ilişki bulurlarken İspanyada yapılan çok merkezli bir çalışmada bir ilişki

bulunamamıştır.^{333,334} Özellikle Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda IL-1 markerları ve gastrik kanser riski arasında ilişki bulunamamıştır.

Ülkemizde IL-1 gen polimorfizmi ve *H.pylori* virulans faktörlerinin gastrik patoloji üzerine etkisiyle ilgili şimdiye kadar yalnızca bir araştırma ile irdelenmiştir. Kontrol grubu kullanmamaları nedeniyle güvenilirliği olumsuz etkilenen Erzin Y. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada³³⁴ *H.pylori* pozitif, dispepsisi olan hastalarda *IL-1B* ve *IL-1RN* polimorfizmlerinin klinik sonuçlarını incelemeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla yaklaşık 90 *H.pylori* pozitif hasta 30'arlı gruplar halinde NÜD, DÜ ve GK gruplarına ayrılarak polimorfizm ve *cagE* ve *BabA2* gen durumunu incelenmişler ve *cagE*, *IL-1RN-1/2* ve *BabA2* genotiplerinin GÜ ve GK'de bağımsız faktörler olduğunu bildirmişlerdir.³³⁴ NÜD hastalarında *IL-1RN-1/1* polimorfizmini GK hastalarından anlamlı oranda yüksek bulmuşlar ve *IL-1RN-1/2* genotipini GK hastalıkla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. *IL-1B-511CC* ve *IL-1B-31TT* genotipleri DÜ'li hastalarda daha sıklıkla bulurlarken *IL-1B- 511TT* genotipini istatistikî olarak anlamlı olmasada GK'li hastalarda daha sık tespit etmişler. Fakat NÜD ve DÜ hasta gruplarını birlikte GK ile mukayese ettiklerinde yalnız *BabA2* ve *IL-1B-31* geni (*CC* veya *CT*) polimorfizmlerinin GK'de bağımsız marker olduklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *1B-31TT* genotipinin malign patolojilere karşı koruyucu bir rol oynayabileceği iddia edilmiştir.³³⁴

Biz çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasındaki *IL-1 RN* alleleri (*SS*, *LS*, *LL*), *IL-1 RN L* allel taşıyıcılığı ve *IL-1 RN S* allel taşıyıcılığı için elde edilen oranlar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulduk ($p<0.05$). Literatürdeki bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda *IL-1 RN L* allel taşıyıcılığı gastrik patoloji riskini 0.168 kat azaltırken (OR (% 95GA): 0,168(0,039-0,725)) *IL-1 RN S* allel taşıyıcılığı ise gastrik patoloji riskini 1,813 kat artırdığı (OR (% 95GA): 1,813(1,094-3,00)) bulunmuştur. Bununla birlikte hasta ve kontrol grubu arasında *IL-1 β -511* polimorfizmi (*CT*, *CC*, *TT*) ve *IL-1 β -511* bölgesinde C taşıyıcılığı, T taşıyıcılığı, *IL-1 β -31* polimorfizmi (*CT*, *CC*, *TT*) ve *IL-1 β -31* bölgesinde C taşıyıcılığı, T taşıyıcılığı, açısından anlamlı bir fark bulunamamış ve gastrik patoloji gelişme riski üzerine etkili olmadıkları bulunmuştur.

Çalışmamızda ülserli ve gastritli hasta grupları arasında *IL-1 β -31* polimorfizmi (*CT*, *CC* ve *TT*) ve *IL-1 β -31* bölgesinde C taşıyıcılığı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır fakat T taşıyıcılığı açısından iki grup arasında elde edilen veriler

arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0,032$) ve T taşıyıcılığın gastrit riskini 0.89 kat azalttığı tespit edilmiştir (OR (% 95GA): 0,89 (0,84-0,94)). Yine ülserli ve gastritli hastalar arasında *IL-1 β* -511 polimorfizmi (CT, CC ve TT) ve *IL-1 β* -511 bölgesinde C taşıyıcılığı, T taşıyıcılığı, *IL-1 RN* polimorfizm durumu (SS, LS, LL), *IL-RN S* allel taşıyıcılığı açısından anlamlı bir fark bulunamamış fakat *IL-RN L* allel taşıyıcılığı açısından iki grup arasında elde edilen fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.03$) ve L allel taşıyıcılığı gastrit riskini 0.30 kat azaltmaktadır (OR (% 95GA): 0,30(0,097-0,94)).

Sonuç olarak bizim çalışmamızda, *H.pylori* ve konak genotiplerinin belirlenmesinin, yüksek kişisel riskli dispeptik hastaların tanımlanmasında ve eradikasyon tedavisi için hastaların seçiminde kullanışlı bir yöntem olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte enfeksiyonun prognozunu belirlenmesinde, konak, bakteri veya her ikisine ait hangi parametrelerin prediktif değer taşıdığı, hangi gruplarda eradikasyon tedavisi uygulanacağı ve eradikasyonun kost efektif olup olmayacağı tartışmalıdır. *H.pylori* ile enfekte kişilerde GK riski % 1-4 arasındadır.³³⁵ Bununla birlikte GK multifaktöryel bir hastalıktır ve diyet alışkanlıkları gibi çevresel faktörler de önemli roller oynayabilmektedir. *H.pylori* ve genotipleri ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki ilişkiyi tespiti yönelik olarak yapılan çalışmalarda, farklı ülkelerde veya bir ülkedeki farklı bölgelerde çalışmaya dahil edilen hastaların genetik özellikleri, beslenme alışkanlıkları, yaş, sigara kullanımı ve ailedeki nüfus sayısı gibi sebeplere bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bir genelleme olarak; bütün dünyada Tip-I suşların prognozu olumsuz yönde etkilediği, *vacA* allellerinden *s1a* ve *s1b*'nin Batı toplumlarında, *s1c* allellerinin de Asya kökenli toplumlarda daha sık görüldüğü söylenebilir. Bu genelleme dışında Tip-I ve Tip-II suşlarının farklı hasta gruplarındaki prevalansı, *cagA* genotipleri ile *vacA* genotiplerinin dağılımı bölgesel özellik göstermektedir. Bu sebeple de, özellikle ülkemiz gibi *H.pylori* enfeksiyonlarının yüksek insidans ve prevalansa sahip olduğu ülkelerde farklı hasta gruplarındaki allel ve genotiplerin belirlenmesi hem genotip ve hastalığın prognozu arasında kurulacak ilişki ile prediktif bir veri sağlaması açısından hastaya, hem de ülkeye ve evrensel tıbbı katkı sağlayacaktır. Eradikasyon tedavisinin daha rasyonel bir tabana oturtulması için GK'de anlamlı olarak sık görülen genetik polimorfizmlerin tespit edilerek riskli hasta ve riskli suşların eradikasyon tedavisine alınması gereklidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gastroduodenal yakınmaları sebebi ile gastroenteroloji polikliniklerine başvuran ve endoskopi endikasyonu alarak tanı amaçlı gastrik biyopsi örnekleri alınan hastaların doku materyallerinde, *H.pylori* kolonizasyonu oranları, kolonize suşlardaki virulans genleri ve allellerinin (*cagA*, *vacAs1-2*, *vacAm1-2*) tespiti ve bir risk faktörü olarak konağa ait *IL1B* (-31 ve -511) ve *IL1RN* gen polimorfizminin tespit edilerek, bakteri ve konağa ait hedef genlerdeki polimorfizmin klinik prognoza muhtemel etkilerinin gösterilmesi amaçlanan çalışmamızın sonucunda:

- 1- *H.pylori* gelişmekte olan ülkelerdeki verilerle uyumlu olarak semptomatik hastalarda % 80,9 gibi yüksek oranlarda kolonize olduğu,
- 2- Gastritli hastalarda *H.pylori* pozitif suşların çoğunun % 64,0 oranıyla daha virulan suşlarda gözlenen *cagA* genini taşımakta olan Tip I genotipinde suşlar olduğu,
- 3- Gastritli hastalarda *H.pylori* izolatlarında *vacA* allellerinden *vacA s1/m2* kombinasyonunun en sık tespit edilen genotip olduğu,
- 4- Mide biyopsi örneklerinde *IL-1B* 511 ve 31 bölgelerinde en sık tespit edilen allelik kombinasyonun sırayla CT/CT, CC/TT olduğu ve bu iki polimorfik bölgenin birbirleriyle yüksek oranda ilişkili olduğu, *IL-1 RN* allellerinden L/S allelinin gastritli hastalarda en sık belirlenen genotip olduğu,
- 5- Hasta ve kontrol grubu kıyaslandığında *IL-1 RN* allelerinde kısa tekrara sahip 2*/2* (SS) allelinin hasta grubunda anlamlı oranda yüksek bulunduğu,
- 6- *IL-1 RN* L allel taşıyıcılığı gastrik patoloji riskini 0,168 kat azalttığı ve *IL-1 RN* S allel taşıyıcılığı ise gastrik patoloji riskini 1,813 kat artırdığı,
- 7- Hasta ve kontrol grubu arasında *IL-1 β* -511,-31 polimorfizmlerinin ve C ve T taşıyıcılığının gastrik patoloji gelişme riski üzerine etkili olmadıkları,
- 8- Hasta grubundaki ülserli ve gastritli hastaları birbirleriyle kıyaslandığında *IL-1 β* -31 polimorfizmi T taşıyıcılığı ülserli hastalarda anlamlı olarak

yüksek bulunduğu ve T taşıyıcılığın gastrit riskini 0,89 kat azaltırken *IL-1 β - 511* polimorfizminin ve C, T taşıyıcılığının ülser ve gastrit üzerine etkisinin olmadığı,

- 9- Yine hasta grubundaki ülserli ve gastritli hastaları birbirleriyle kıyaslandığında *IL-1RN L* allel taşıyıcılığı gastritli hastalarda anlamlı oranda yüksek olduğu ve L allel taşıyıcılığı gastrit riskini 0,30 kat azalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız, *H.pylori* ve konak genotiplerinin belirlenmesinin, yüksek kişisel riske sahip dispeptik hastaların tanımlanmasında ve eradikasyon tedavisi için hastaların seçiminde kullanışlı bir yöntem olabileceğini vurgulanmaktadır. Bununla birlikte hangi faktörlerin araştırılacağı (konak, bakteri veya her ikisi) ve hangi grupların eradikasyon tedavisi uygulanacağı ve kost efektif olup olmayacağın belirlenmesi için iyi planlanmış prospektif, longitidinal ve tercihen büyük popülasyonlu ulusal düzeyde çalışmalarla araştırılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **David A Baltrus et al.** The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27 J. Bacteriol., Vol. 191, No. 1. **2009**; pp. 447-448.
2. **Marshall B J, and J R Warren.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, **1984**; i:1311-1315.
3. **Karin van Amsterdam, Arnoud HM van Vliet, Johannes G Kusters and Arie van der Ende.** Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related Diseases. FEMS Microbiol Rev 30, **2006**; 131-156.
4. **Peter Borriello, Patrick R Murray and Guido Funke.** Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edition, Bacteriology, Volume 2, ASM Press, **2006**; p1563-1590.
5. **Wirth T, Wang X, Linz B, Novick RP, Lum JK, Blaser M, Morelli G, Falush D & Achtman M.** Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. Proc Natl Acad Sci. USA, **2004**; 101: 4746-4751.
6. **Warren JR and BJ Marshall.** Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, **1983**; i:1273-1275.
7. **Marshall BJ.** History of the discovery of *Campylobacter pylori*, **1989**; p. 7-24. In M. J. Blaser, *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease, Igaku Shoin Publishers.
8. **Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB and Glancy RJ.** Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. Med J Aust **1985**; 142: 436-439.
9. **Morris A and Nicholson G.** Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. Am J Gastroenterol **1987**; 82: 192-199.
10. **Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. J. Infect. Dis. **1990**; 161:626-633.
11. **Jones DM, AM Less IIs, and J Eldridge.** *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. J. Clin. Pathol. **1984**; 37:1002-1006.
12. **Langenberg. MLGNJ Tytgat, MEI Schipper, PJGM Rietra, and HC Zanen.** *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. Lancet, **1984**; i:1348.
13. **McNulty CMA and DM Watson.** Spiral bacteria of the gastric antrum. Lancet, **1984**; i:1068-1069.
14. **Blaser MJ.** Gastric *campylobacter*-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. Gastroenterology, **1987**; 93:371-383.
15. **Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W and Harper WES:** Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol., **1989**; 39, 397-405.

16. **McNulty CAM, Dent JC, et al.** New spiral bacterium in gastric mucosa. *J Clin Pathol*, **1989**; 42, 585-91.
17. **Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R and De Ley J:** Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1991**, 41, 88-103.
18. **Forman D, DG Newell, F Fullerton, JW Yarnell, AR Stacey, N Wald, and F Sitas.** Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br. Med. J.* **1991**; 302:1302–1305.
19. **Nomura, A, GN Stemmermann, PH Chyou, I Kato, GI Perez-Perez, and MJ Blaser.** *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* **1991**; 325:1132–1136.
20. **Parsonnet J, GD Friedman, DP Vandersteen, Y Chang, JHVogelman, N Orentreich, and RK Sibley.** *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1991**; 325:1127–1131.
21. **Talley NJ, AR Zinsmeister, A Weaver, EP DiMagno, HA Carpenter, GI Perez-Perez, and MJ Blaser.** Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**; 83:1734–1739.
22. **NIH Consensus Conference.** *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*, **1994**; 272:65–69.
23. **Fox JG.** The non-*H.pylori* *Helicobacters*: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, **2002**; 50:273-283.
24. **Tee W, Hinds S, Montgomery J and Dyall-Smith ML.** A Probable New *Helicobacter* Species Isolated from a Patient with Bacteremia. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2000**; 38(10):3846–3848.
25. **Falush D, Wirth T, et al.** Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, **2003**; 299, 1582-5.
26. **Ste'phanie Bury-Mone, et al.** Presence of Active Aliphatic Amidases in *Helicobacter* Species Able To Colonize the Stomach. *Infection And Immunity*, Oct. **2003**; Vol. 71, No. 10. p. 5613–5622.
27. **Fox JG, et all.** Hepatic species identified in bile and gallbladder tissue from chileans with chronic cholecystitis *Gastroenterology*, Volume 114, **1998**; Issue 4, Pages 755-763.
28. **Abayli B, Colakoglu S.** *Helicobacter pylori* in the etiology of cholesterol gallstones. *J Clin Gastroenterol.* **2005**; 39(2):134-7.
29. **Suzuki N et all.** Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *J Med Microbiol.* **2008**; 57(Pt 12):1553-9.
30. **Goodwin CS, Armstrong J A, Marshall BJ.** *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J Clin Pathol.* **1986**; 39(4):353–365.
31. **Peña JA, McNeil K, Fox JG, Versalovic J.** Molecular evidence of *Helicobacter cinaedi* organisms in human gastric biopsies. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:1511-1513.
32. **Avenauid et all.** Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer.* **2000**; 89(7):1431-9.

33. **Goodwin CS, Worsley BW.** Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am. **1993**; 22(1):15-19.
34. **Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt.** The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition Volume 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. P **2006**; 139-170.
35. **AP Moran, B Lindner, and EJ Walsh.** Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides J Bacteriol. **1997**; 179(20): 6453–6463.
36. **M Haque, Y Hirai, K Yokota, N Mori, I Jahan, H Ito, H Hotta, I Yano, Y Kanemasa, and K Oguma.** Lipid profile of *Helicobacter* spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. J Bacteriol. **1996** April; 178(7): 2065–2070.
37. **Harry LT Mobley, George L Mendz and Stuart L Hazell.** *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. **2001**; 978-1-55581-213-3. ASM Pres.
38. **Appelmelk BJ, et al.** Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. Infect. Immun. **1996**; 64:2031-2040.
39. **Owen RJ.** *Helicobacter* species classification and identification. British Medical Bulletin **1998**; 54 (No. 1): 17-30.
40. **Moran AP, B Lindner and EJ Walsh.** Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. J. Bacteriol., Oct **1997**; 6453-6463, Vol 179, No. 20.
41. **Richard A. Alm, James Bina, Beth M. Andrews, Peter Doig, Robert E. W. Hancock, and Trevor J. Trust.** Comparative Genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the Outer Membrane Protein Families. Infection and Immunity, July **2000**; p. 4155-4168, Vol. 68, No. 7.
42. **Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JI, et al.** Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. Gut **1990**; 31:134–138.
43. **Noach LA, Rolf TM, Tytgat G N.** Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. J Clin Pathol **1994**; 47:699–704.
44. **Camorlinga-Ponce M, Romo C, Gonzalez-Valencia G, et al.** Topographical localisation of cagA positive and cagA negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa: an in situ hybridisation study. J Clin Pathol **2004**; 57:822–828.
45. **Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S.** Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science. **1993**; 262: 1892–1895.
46. **Ilver D, A Arnquist, J Ögren, I Frick, D Kersulyte, ET Incecik, D E Berg, A Covacci, L Engstrand, and T Borén.** *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science **1998**; 279:373-377.
47. **Valkonen KH, Wadstrom T, Moran A P.** Identification of the N-acetylneuraminyllactose specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. **1997**; 65: 916–923.
48. **Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, et al.** Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. Nucleic Acids Res **1999**; 27:3325–3333.
49. **Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, et al.** *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. Gut **2006**; 55:1360–1361.

50. **Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, et al.** Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J Med Microbiol* **2004**; 53: 375–379.
51. **Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ, Graham DY, Lee CH.** Cloning, nucleotide sequence and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **1993**; 175: 674–683.
52. **Kostrzynska M, O'Toole PW, Taylor DE, Trust TJ.** Molecular characterization of a conserved 20 kDa membrane-associated lipoprotein antigen of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **1994**; 176: 5938–5948.
53. **Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J.** Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect. Immun.* **2000**; 68: 3337–3343.
54. **Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA.** Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **1998**; 66: 4061–4067.
55. **Pantzar M, Ljungh Å, Wadström T.** A vitronectin binding protein of *Helicobacter pylori* is identical with catalase. *Gut.* **1999**; 45(Suppl. III): A27.
56. **Alm R. A et al.** Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **1999**; 397: 176–180.
57. **Suerbaum S, Josenbaas C, Labigne A.** Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin genes and construction of *H.pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* **1993**; 175: 3278–3288.
58. **Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW, Trust TJ.** Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J. Bacteriol.* **1991**; 173: 937–946.
59. **Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S.** Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J. Bacteriol.* **1995**; 177: 3010–3020.
60. **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.
61. **National Center for Biotechnology Information (NCBI)** internet sitesi. Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Erişim tarihi: 11.10.2008.
62. **Dawn A Israel et al.** *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single uman host, *PNAS*, December 4, **2001**; vol. 98, no. 25. 14625–14630.
63. **E Vega, Teresa I Cortiñas, Claudia M Mattana, Humberto J Silva, and Olga Puig de Centorbi.** Growth of *Helicobacter pylori* in Medium Supplemented with Cyanobacterial Extract. *Alba J Clin Microbiol.* **2003** December; 41(12): 5384–5388.
64. **Köksal F, Topçu A, Söyletir G, Doğanay M.** *Helicobacter pylori* İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İkinci baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**.

65. **Dunn BE, Cohen B, Blaser MJ.** *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev **1997**; 10:720-741.
66. **Goodwin CS, Worsley BW.** Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am. **1993**; 22(1):15-19.
67. **The European Helicobacter pylori Study Group.** Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. Gut, **1997**; 41:8–13.
68. **Adams BL, TC Bates, and JD Oliver.** Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. Applied and Environmental Microbiology, December **2003**; p. 7462-7466, Vol. 69, No. 12.
69. **Falush D, Wirth T, Linz B, et al.** Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science, **2003**; 299:1582–1585.
70. **Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al.** An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature **2007**;445:915–918.
71. **Weyermann M, Adler G, Brenner H, et al.** The mother as source of *Helicobacter pylori* infection. Epidemiology **2006**; 17:332–334.
72. **Kivi M, Johansson AL, Reilly M, et al.** *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. Epidemiol Infect **2005**; 133:645–652.
73. **McCallion WA, Murray LJ, Bailie AG, et al.** *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. Gut **1996**; 39:18–21.
74. **Bardhan PK.** Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. Clin Infect Dis **1997**; 25:973–978.
75. **Kalach N, Gergeret M, Benhamou PH et al.** High levels of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains in children. J Clin Microbiol **2001**; 39:394–7.
76. **Brown LM.** *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev **2000**; 22:283–297.
77. **Q Song, T Lange, A Spahr, G Adler and G Bode.** Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. J. Med. Microbiol. Vol. 49, **2000**; 349-353.
78. **Mitchell HM, A Lee and J Carric.** Increased Incidence of *Campylobacter pylori* Infection in Gastroenterologists: Further Evidence to Support Person-to-Person Transmission of *C. pylori*. Scandinavian Journal of Gastroenterology.**1989**; Vol. 24, No. 4, Pages 396-400.
79. **Roger A Feldman, A James P Eccersley and Jeremy M Hardie.** Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio British Medical Bulletin **1998**; 54:39-53.
80. **LB Polish, JM Douglas Jr, AJ Davidson, GI Perez-Perez and MJ Blaser.** Characterization of risk factors for *Helicobacter pylori* infection among men attending a sexually transmitted disease clinic: lack of evidence for sexual transmission. J Clin Microbiol. **1991** October; 29(10): 2139-2143.
81. **Hocker M, Hohenberger P.** *Helicobacter pylori* Virulence Factors - one Part of a Big Picture. Lancet, **2003**; 362(9391):1231-1233.

82. **KA Eaton, DR Morgan and S Krakowka.** *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* **1989** April; 57(4): 1119-1125.
83. **Eaton KA, S Krakowka.** Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, September **1994**; p. 3604-3607, Vol. 62, No. 9. 0019-9567.
84. **Suerbaum S, Thiberge JM, Kansau I, et al.** *Helicobacter pylori* HspA-HspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol* **1994**; 14:959-974.
85. **S Fujimoto, O Olaniyi Ojo, A Arnqvist, JY Wu, S Odenbreit, R Haas, DY Graham, Y Yamaoka.** *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol*, Vol. 5, No. 1. **2007**; pp. 49-58.
86. **Andrew G Harris, Francis E Hinds, Anthony G Beckhouse, Tassia Kolesnikow and Stuart L Hazell.** Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874). *Microbiology* **2002**; 148, 3813–3825.
87. **David J McGee, et al.,.** *Helicobacter pylori* Thioredoxin Is an Arginase Chaperone and Guardian against Oxidative and Nitrosative Stresses. *J. Biol. Chem.*, Vol. 281, Issue 6, **2006**; 3290-3296.
88. **Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, et al.** Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* **1995**; 73:760–770.
89. **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.
90. **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.
91. **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.
92. **Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, et al.** Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am J Epidemiol* **2004**; 159:252–258.
93. **Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, et al.** Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **2005**; 59:451–485.
94. **Censini S, Lange C, Xiang Z, 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: 14648–14653.
95. **Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al.** Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **2004**; 5:1166–1174.
96. **Segal ED, Falkow S, Tompkins LS.** *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93:1259–1264.
97. **Backert S, Ziska E, Brinkmann V, et al.** Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* **2000**; 2:155–164.

98. **Tammer I, Brandt S, Hartig R**, et al. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* **2007**; 132:1309–1319.
99. **Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R**, et al. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **2002**; 43:971–980.
100. **Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A**, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99:14428–14433.
101. **Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R**, et al. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **2002**; 43:971–980.
102. **Bagnoli F, Buti L, Tompkins L**, et al. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102:16339–16344.
103. **Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A**, et al. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **2003**; 300:1430–1434.
104. **Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y**, et al. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the Beta catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **2007**; 26:4617–4626.
105. **Franco AT, Israel DA, Washington MK**, et al. Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102:10646–10651.
106. **Ogura K, Maeda S, Nakao M**, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* **2000**; 192:1601–1610.
107. **Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y**, et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis* **2003**; 187:334–337.
108. **Shibata W, Hirata Y, Maeda S**, et al. CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J Pathol* **2006**; 210: 306–314.
109. **Rieder G, Merchant JL, Haas R**. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* **2005**; 128:1229–1242.
110. **Cover TL, Tummuru MK, Cao P**, et al. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* **1994**; 269:10566–10573.
111. **Shibata W, Hirata Y, Maeda S**, et al. CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J Pathol* **2006**; 210: 306–314.
112. **Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K**, et al. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* **2007**; 13:470–476.
113. **Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL**, et al. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* **1999**; 450:101–104.

114. **Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr.** Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol. Chem* **1995**; 270:17771–17777.
115. **Letley DP, Lastovica A, et al.** Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the *VacA s1a* genotype and natural occurrence of *ans2/m1* allele. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37, 1203-5.
116. **Reyrat JM, Rappuoli R, Telford JL.** A structural overview of the *Helicobacter* cytotoxin. *Int J Med Microbiol* **2000**;290:375–379.
117. **Nguyen VQ, Caprioli RM, Cover TL.** Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* **2001**; 69:543–546.
118. **Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, et al.** *VacA* from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* **1999**; 450:101–104.
119. **Ilver D, Barone S, Mercati D, et al.** *Helicobacter pylori* toxin *VacA* is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol* **2004**; 6:167–174.
120. **Kinnosuke Yahiro.** Activation of *Helicobacter pylori* *VacA* Toxin by Alkaline or Acid Conditions Increases Its Binding to a 250-kDa Receptor Protein-tyrosine Phosphatase β *Journal of Biological Chemistry*, **1999**; p274-277.
121. **Akihiro Fujikawa.** Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by *VacA* of *Helicobacter pylori* *Nature Genetics*. **2003**; 375-381.
122. **Pagliaccia C, de Bernard, M, et al.** The m2 form of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**; 10212-17.
123. **Willhite DC, Blanke SR.** *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* **2004**; 6:143–154.
124. **Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, et al.** *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem* **2006**;281: 11250–11259.
125. **Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, et al.** Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by *VacA* of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* **2003**; 33:375–381.
126. **Gebert B, Fischer W, Weiss E, et al.** *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **2003**; 301:1099–1102.
127. **Ogura K, Maeda S, Nakao M, et al.** Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* **2000**; 192:1601–1610.
128. **Salama NR, Otto G, Tompkins L, et al.** Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a Mouse model of infection. *Infect Immun* **2001**; 69:730–736.
129. **Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, Miehle S, Classen M, Prinz C:** Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**; 96:12778–12783.
130. **Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS and Graham DY.** Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production *Gastroenterology*, **2002**; 123:414-424.,118,119.

131. **Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, Crawford S** et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA Protein Expression and oipA Gene Switch Status. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**; 42(5):2279–2281.
132. **Santos A, D M Queiroz, A Menard, A Marais, G A Rocha, C A Oliveira, A M Nogueira, M Uzeda and F Megraud.** New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome, *J. Clin. Microbiol.* 41, **2003**; pp. 1651–1655.
133. **Dorrell N** et al. Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. *Gastroenterology*. **1999** Nov; 117(5):1098-104.
134. **Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP.** Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL-1Ra) Is an Acute-Phase Protein. *J. Clin. Invest.* **1997** Jun 15; 99(12):2930-40.
135. **FS di Giovine, E Takhsh, AIF Blakemore, and GW Duff.** Single base polymorphism at –511 in the human *interleukin-1 β* gene (*IL1 β*). *Hum Mol Genet.* **1992**; Sep;1(6):450.
136. **Buchs N, FS di Giovine, T Silvestri, E Vannier, GW Duff and P Miossec.** *IL-1B* and *IL-1Ra* gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. June **2001**; Volume 2, Number 4, Pages 222-228.
137. **Meenakshi Chakravorty,** Arunima Ghosh, Abhijit Choudhury, Amal Santra, Jobaranjan Hembrum and Susanta Roychoudhury. Interaction Between *IL1B* Gene Promoter Polymorphisms in Determining Susceptibility to *Helicobacter pylori* Associated Duodenal Ulcer Human Mutation, **2006**; 27(5),411-419.
138. **Ruzzo A, F. Graziano, F Pizzagalli, D Santini, V Battistelli, S Panunzi, E Canestrari, V Catalano, B Humar, R Ficarelli, I Bearzi, S Cascinu, N Naldi, E Testa & M Magnani.** *Interleukin 1B* gene (*IL-1B*) and *interleukin 1 receptor antagonist* gene (*IL-1RN*) polymorphisms in *Helicobacter pylori* negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype *Annals of Oncology* **2005**; 16: 887–892.
139. **Zeng ZR, PJ Hu, S Hu, RP Pang, MH Chen, M Ng, JJY Sung.** Association of *interleukin 1B* gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* **2003**; 52:1684–1689.
140. **Joanna K Tarlow,** Alexandra I F Blakemore, Andrew Lennard, Roberto Solari, Howard N Hughes, Alexander Steinkasserer and Gordon W. Duff. Polymorphism in human *IL-1 receptor antagonist* gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Human Genetics* **1993**; 91(4) 403-404.
141. **Danis VA, Millington M, Hyland VJ,** et al. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an *IL-1 receptor antagonist* (*IL-1ra*) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* **1995**; 199:303–10.
142. **Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S.** Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000**; 20:2394–2400.
143. **McGarry F, J Neilly, N Anderson, R Sturrock and M Field.** A polymorphism within the *interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra)* gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology* **2001**; 40: 1359-1364.
144. **El-Omar EM, Carrington M, Chow WH** et al. *Interleukin-1* polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **2000**; 404: 398–402.

145. **El-Omar EM, Carrington M, Chow WH** et al. The role of the *Interleukin-1* polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature* **2001**; 412: 99.
146. **Manuel R. Amieva and Emad M. El-Omar**. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, **2008**; 134:306–323.
147. **Meenakshi Chakravorty**, Arunima Ghosh, Abhijit Choudhury, Amal Santra, Jobaranjan Hembrum, and Susanta Roychoudhury. Interaction Between *IL1B* Gene Promoter Polymorphisms in Determining Susceptibility to *Helicobacter pylori* Associated Duodenal Ulcer Human Mutation **2006**; 27(5),411-419.
148. **El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD**, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* **2003**; 124:1193–1201.
149. **Machado JC, Figueiredo C, Canedo P**, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* **2003**;125:364–371.
150. **Ando T, El-Omar EM, Goto Y**, et al. Interleukin 1B proinflammatory genotypes protect against gastro-oesophageal reflux disease through induction of corpus atrophy. *Gut* **2006**;55:158–164.
151. **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.
152. **Zeng ZR, Hu PJ, Hu S**, et al. Association of *interleukin 1B* gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* **2003**; 52:1684–1689.
153. **Palli D, Saieva C, Luzzi I**, et al. *Interleukin-1* gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *Am J Gastroenterol* **2005**; 100:1941–1948.
154. **Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P**, et al. *Helicobacter pylori* and *interleukin 1* genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **2002**; 94:1680–1687.
155. **Machado JC, Pharoah P, Sousa S**, et al. *Interleukin 1B* and *interleukin 1RN* polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* **2001**; 121:823–829.
156. **Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P**, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **2002**; 94:1680–1687.
157. **Wang P, Xia HH, Zhang JY**, et al. Association of *interleukin-1* gene polymorphisms with gastric cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* **2007**;120:552–562.
158. **Camargo MC, Mera R, Correa P**, et al. *Interleukin-1* and *interleukin- 1 receptor antagonist gene* polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**; 15:1674–1687.
159. **Tu S, Cui G, Takaishi S**, et al. Overexpression of human interleukin-1 in transgenic mice results in spontaneous gastric inflammation and carcinogenesis. *Gastroenterology* **2005**; 128(Suppl 2):A62.
160. **Smith MG, Hold GL, Rabkin CS**, et al. The *IL-8-251* promoter polymorphism is associated with high IL-8 production, severe inflammation and increased risk of pre-malignant changes in *H. pylori* positive subjects. *Gastroenterology* **2004**; 124(Suppl 2):A23.

161. **Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K**, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2005**; 14:2487–2493.
162. **Lu W, Pan K, Zhang L**, et al Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* **2005**; 26:631–636.
163. **Su B, Ceponis PJ, Lebel S**, et al. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* **2003**; 71:3496–3502.
164. **Pasare C, Medzhitov R**. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* **2005**; 560:11–18.
165. **Hold GL, Rabkin CS, Chow WH**, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology* **2007**;132:905–912.
166. **Sanduleanu S**, Jonkers D, De Bruine A, et al. Double gastric infection with *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* bacteria during acid-suppressive therapy: increase of pro-inflammatory cytokines and development of atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* **2001**; 15:1163–1175.
167. **Zavros Y, Rieder G, Ferguson A**, et al. Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology* **2002**; 122:119–133.
168. **Lai LH, Sung JJY**. *Helicobacter pylori* and benign upper digestive disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **2007**; 21:261-279.
169. **Ferrero RL**. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Molecular Immunology* **2005**; 42:879-885.
170. **George JT, Boughan PK, Karageorgio H, Bajaj-Elliot M**. Host antimicrobial response to *Helicobacter pylori* infection. *Molecular Immunology* **2003**; 40:451-456.
171. **Robinson K, Argent R H, Atherton J C**. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **2007**; 21:237-259.
172. **Lochhead P, El-Omar EM**. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **2007**; 21:281-297.
173. **Lai LH, Sung JJY**. *Helicobacter pylori* and benign upper digestive disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **2007**; 21:261-279.
174. **Johnston JB, Rahman MM, McFadden G**. Strategies that modulate inflammasomes-insights from host-pathogen interactions. *Semin Immunopathol* **2007**; 29:261-274.
175. **Werts C, Bourhis L**, et al. Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF- κ B pathway. *Eur j Immunol* **2007**; 37:2499-2508.
176. **Johnston JB, Rahman MM, McFadden G**. Strategies that modulate inflammasomes-insights from host-pathogen interactions. *Semin Immunopathol* **2007**; 29:261-274.
177. **Viala J, Chaput C**, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature Immunology* **2004**; 5:1166-1174.

178. **Fritz JH**, Bourhis L L, Sellge G, Magalhaes J G, Fsihi H, Kufer T A, Collins C, Viala J, Ferrero R L, Girardin S E, Philpott D J. Nod1 mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* **2007**; 26:445-459.
179. **Achyut BR, Uday CG, Nickhil M, Mittal B**. Association of Toll-like receptor-4 (Asp299gly and Thr 399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Human Immunology* **2007**; 68:901-907.
180. **Robinson K, Argent RH, Atherton JC**. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **2007**; 21:237-259.
181. **Boughan PK, Argent RH, et al**. Nucleotide binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor, critical regulators of β -defensins during *Helicobacter pylori* infection. *The journal of Biological Chemistry* **2006**; 281:11637-11648.
182. **D'Ellos MM, Andersen LP**. *Helicobacter pylori* inflammation, immunity and vaccines. *Helicobacter* **2007**; 12:15-19.
183. **Zhao Y, Yokota K, Ayada K, Y Yumiko Okada T, Shen L, Oguma K**. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 induces interleukin-8 via a toll like receptor (TLR)2 and mitogen activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *Journal of Medical Microbiology* **2007**; 56:154-164.
184. **Polenghi A, Bossi F, et al**. The neutrophil activating protein of *helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vitro. *The Journal of Immunology* **2007**; 178:1312-1320.
185. **Suerbaum S and Michetti P**, *Helicobacter pylori* infections. *New Engl. J. M* **2002**; 347:1175–1186.
186. **Labenz J, Malfertheiner P**. *H.pylori* in gastrooesophageal reflux disease: Causal agent, independent or protective factor? *Gut*. **1997**; 41:277-80.
187. **Vicari J, Falk GW, Richter JE**. *H.pylori* and acid peptic disorders of the esophagus: Is it conceivable? *Am J GastroenteroI*. **1997**; 92:1097-102.
188. **Özkaya İA**. Hemodiyaliz Hastalarında *H.pylori* İnfeksiyonu Sıklığı ve Bunun Dispeptik yakınmalarla ilişkisi. Uzmanlık tezi. Bakırköy Dr. Sadikonuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2005**.
189. **J Parsonnet**, GD Friedman, DP Vandersteen, Y Chang, JH Vogelman, N Orentreich, and RK Sibley. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *NEJM*, **1991**; Volume 325:1127-1131.
190. **Ernst J Kuipers, 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**; Vol. 87, No. 23, 1777-1780.
191. **Bayerdorffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, & Stolte M**. 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.
192. **Francesco Franceschi and Antonio Gasbarrini**. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. **2007**; Vol. 21, No. 2, pp. 325-334.
193. **Kenneth W Tsang and Shu-Kum Lam**. *Helicobacter pylori* and extra-digestive diseases *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **1999**; 14, 844–850.

194. **Giuseppe Realdi, Maria P Dore, Laura Fastame.** Extradigestive Manifestations Of *Helicobacter Pylori* Infection. Digestive Diseases And Sciences, **1999**; Vol. 44, No. 2. Pp. 229 ± 236.
195. **Weiss J, J Mecca, E da Silva, and D Gassner.** Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. J Clin Microbiol. **1994** July; 32(7): 1663–1668.
196. **Granberg C, et al.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by using pyloriset EIA-G and EIA-A for detection of serum immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies. J Clin Microbiol. **1993** June; 31(6): 1450–1453.
197. **Fanti Lorella Ieri, et al.** Long-term Follow-up and Serologic Assessment After Triple Therapy with Omeprazole or Lansoprazole of *Helicobacter*-associated Duodenal Ulcer. Journal of Clinical Gastroenterology: January **2001**; Volume 32, Issue 1, pp 45-48.
198. **Yamamoto, K Kojima, M Sanaka, T Ishii, Y Osaki, H Tsutsumi, A Tsuchiya, Y Kuyama, S Uchida.** Reliability of rapid urinary test for antibody to *Helicobacter pylori* in adult patients with proteinuria. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, **2006**; Volume 54, Issue 2, Pages 105-108.
199. **Katarzyna Dzier Anowska-Fangrat, Philippe Lehours, Francis Mégraud and Danuta Dzieranowska.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection.**2006**; Helicobacter 11 (Suppl.1): 6–13.
200. **Vaira and Vakil.** Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. Gut **2001**; 48:287-289; doi:10.1136/gut.48.3.287.
201. **Stephanie A Chisholm, Claire L Watson, E Louise Teare, Seth Saverymuttu and Robert J Owen.** Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients by stool antigen detection: does the rapid immunochromatography test provide a reliable alternative to conventional ELISA kits? J Med Microbiol 53, **2004**; 623-627.
202. **Leodolter A, D Vaira, F Bazzoli, K Schütze, A Hirschl, F Mégraud & P Malfertheiner.** European multicentre validation trial of two new non-invasive tests for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, **2003**; Volume 18 Issue 9, Pages 927–931.
203. **Koletzko S et al.** Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. Gut **2003**; 52:804-806.
204. **Jaime R, Noriega Z, Francisco J, Guillermo P, Rolando TM, Juan PF, Héctor JMG, Elvira G.** Diagnostic Utility of Invasive Tests and Serology for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Different Clinical Presentations Archives of Medical Research **2006**; 37:123-128.
205. **Gomollón J Ducons A, Santolaria S, Lera I, Omiste R, Guirao M, Breath test is very reliable for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in real clinical practice Digestive and Liver Disease, 2003; 9:612-618.**
206. **Trebesius, K Panthel, K. Et al.** Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolid resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. Gut, **2000**; 46. 608-14.
207. **Price AB.** The Sydney system: histological division. J Gastroenterol Hepatol **1991**; 6:209–222.
208. **Robert ME, Weinstein WM.** *Helicobacter pylori*-associated gastric pathology. Gastroenterol Clin N Am **1993**; 22: 59.

209. **Bayerdörffer E**, H Oertel, N Lehn, G Kasper, GA Mannes, T Sauerbruch, M Stolte. Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonisation. Journal of Clinical Pathology. Journal of Clinical Pathology **1989**; 42:834-839.
210. **Sipponen P, Kekki M, Siurala M**. The Sydney System: epidemiology and natural history of chronic gastritis. J Gastroenterol Hepatol. **1991** May-Jun;6(3):244-51.
211. **Dent J C, McNulty CAM**. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **1988**; 7:555–558.
212. **Kiehlbauch JA**, D J Brenner, D N Cameron, A G Steigerwalt, J M Makowski, C N Baker, C M Patton, and I K Wachsmuth. Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. J Clin Microbiol. **1995** November; 33(11): 2940–2947.
213. **Gomollón J Ducons A**, Santolaria S, Lera I, Omiste R, Guirao M. Breath test is very reliable for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in real clinical practice Digestive and Liver Disease, **2003**; 9:612-618.
214. **Leodolter A, K Wolle, P Malfertheiner**. Current Standards in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Dig Dis **2001**; 19:116-122.
215. **Casazza S, Tunesi G, Marinaro E, Caruso F, Canepa M, Michetti P**, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in 201 stomach biopsies using the polymerase chain reaction, histological staining (H&E/Giemsa) and immunohistochemistry. Pathologica 1997; 89:405-11.
216. **Lu JJ**, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SKF, et al. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. Journal of Clinical Microbiology **1999**; 37:772–4.
217. **Pacheco N** et al. Comparison of PCR and common clinical tests for the diagnosis of *H.pylori* in dyspeptic patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 39 **2001**; 207–210.
218. **Lu JJ**, Perng CL, Shyu RY, Chen CH et al. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. Journal of Clinical Microbiology, **1999**; 37(3):772–774.
219. **Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M** et al. Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. Journal Of Clinical Microbiology, **2005**; 43(8):3906–3916.
220. **Gatta LD, Ricci C and Miglioli M**. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther, **2002**; 16(1):16–23.
221. **Köksal F**. *Helicobacter pylori* Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Haziran-01 Temmuz, Ankara, Program ve Bildiri Özet Kitabı, **2004**; 99-111.
222. **Lurdes Monteiro**, Mo´ nica Oleastro, Philippe Lehours and Francis Me´ graud. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **2009**; Helicobacter 14 (Suppl. 1): 8–14.
223. **Tytgat GNJ**. Review article: treatments that impact favourably upon the eradication of *Helicobacter pylori* and ulcer recurrence. Volume 8, **1994**; Issue 4, Pages 359-368.
224. **Malfertheiner P**, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther. **2002** Feb; 16(2):167-80.

225. **Adam Harris, J J Misiewicz.** Management of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* **2001**; 323:1047-1050.
226. **Hans-Joachim Ulmer, Andree Beckerling and Gudrun Gatz.** Recent Use of Proton Pump Inhibitor-Based Triple Therapies for the Eradication of *H. pylori*: A Broad Data Review. Volume 8, **2003**; Issue 2, Pages 95 - 104.
227. **Cremonini, F. Canducci F. et al.** *Helicobacter pylori* treatment: a role of probiotics? *Dig Dis*, **2001**; 19, 144-7.
228. **Francis Megraud.** *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* **2007**;56:1502.
229. **Cliona McNulty, and the PHLS Helicobacter Working Group.** *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2002**; 49, 601-609.
230. **Mina Boka et al.** Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Infection in Children Using Stool Sample. Volume 10, **2005**; Number 3, 601-609.
231. **Graham D Malaty, H M, Evans, D G Evans, D J, Jr, Klein, P D. & Adam, E.** Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology*, **1991**; 100, 1495-1501.
232. **Lehours P, Yilmaz O.** Epidemiology *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **2007**; 12 (Suppl 1): 1-3.
233. **Hoda M Malaty, Lars Engstrand, Nanc L Pedersen and David Y Graham.** *Helicobacter pylori* Infection: Genetic and Environmental Influences: A Study of Twins., *Annals of Internal Medicine*, vol. 120, **1994**; no. 12, 982-986.
234. **Suerbaum S and Michetti P,** *Helicobacter pylori* infections. *New Engl. J. M* **2002**; 347:1175–1186.
235. **Magdalena Chmiela and Pierre Michetti.** Inflammation, Immunity, Vaccines for *Helicobacter* Infection. *Helicobacter* 11, 2006; (Suppl. 1): 21–26.
236. **Aebischer T, Bumann D, Epple HJ, et al.** Development of a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **2005**; 10:547.
237. **Caroline D Skene, Christopher Doidge, Philip Sutton.** Evaluation of ISCOMATRIX™ and ISCOM™ vaccines for immunisation against *Helicobacter pylori*. *Vaccine* 26 2008; 3880–3884.
238. **Graham DY, Opekun AR, Osato MS, et al.** Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* **2004**; 53:1235–43.
239. **Kalendar R.** FastPCR Software, University of Helsinki. Erişim: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm>. Erişim Tarihi: 01.07.2008.
240. **SPSS Inc.** SPSS for Windows. Version 15.0, Chicago: SPSSInc., **2007**.
241. **Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb A, Warnke R.** *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, **1994**; 330:1267-71. 25.
242. **Ahmed N, Sechi LA.** *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathology: New Threats of the Old Friend. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **2005**; 4 (1):1-10. 26.

243. **Zhang ZF**, Robert C, Kurtz D, Klimstra S et al. *Helicobacter pylori* Infection on the Risk of Stomach Cancer and Chronic Atrophic Gastritis. *Cancer Detection and Prevention*, **1999**; 23(5):357.
244. **Brooks HJL**, Ahmed D, McConnell MA and Barbezat GO. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction: Is it worth it? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50 **2004**; 1–5.
245. **Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins ML**. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Lett Appl Microbiol* **2004**; 39: 221-225.
246. **Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE**. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* **1993**; 39: 338-44.
247. **Clayton CL**, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 192-200.
248. **Lu J-J**, Perng C-L, Shyu R-Y, Chen C-H, Lou O, Sonny K, Chong F, Lee C-H. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 37, No. 3 Mar. **1999**, p. 772–774.
249. **Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A**. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR. *J Clin. Microbiol* **1995**; 33:2752-2756.
250. **Singh V**, Mishra S, Rao G R K, Jain A K., Dixit V K, Gulati A K, Mahajan D, McClelland M and Nath G. Evaluation of Nested PCR in Detection of *Helicobacter pylori* Targeting a Highly Conserved Gene: HSP60. *Helicobacter* **2008**; 13:30–34.
251. **Pounder RE, Ng D**. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*. **1995**; 9 Suppl 2:33-9.
252. **Bardhan PK**. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* **1997**; 25:973–978.
253. **Go MF**. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **2002**; 16: 3-15.
254. **Goodman KJ, Cockburn M**. The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemiology* **2001**; 12:266–71.
255. **Nurgalieva Z**, Goodman KJ, Phillips CV, Fischbach L, de la Rosa JM, Gold BD. Correspondence between *Helicobacter pylori* antibodies and urea breath test results in a US-Mexico birth cohort. *Paediatr Perinat Epidemiol* **2008**; 22:302–12.
256. **Mishra S**, Singh V, Rao GR, Dixit VK, Gulati AK, Nath G. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects – a nested PCR based study. *Infect Genet Evol* **2008**; 8:815–9.
257. **Naito Y**, Shimizu T, Haruna H, Fujii T, Kudo T, Shoji H, et al. Changes in the presence of urine *Helicobacter pylori* antibody in Japanese children in three different age groups. *Pediatr Int*, **2008**; 50:291–4.
258. **Zagari RM**, Fuccio L, Wallander MA, Johansson S, Fiocca R, Casanova S, et al. Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and Barrett’s oesophagus in the general population: the Loiano-Monghidoro study. *Gut*, **2008**; 57:1354–9.
259. **Cherian S**, Forbes D, Sanfilippo F, Cook A, Burgner D. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in African refugee children resettled in Australia. *Med J Aust* **2008**;189:438–41.

260. **Naito Y**, Shimizu T, Haruna H, Fujii T, Kudo T, Shoji H, et al. Changes in the presence of urine *Helicobacter pylori* antibody in Japanese children in three different age groups. *Pediatr Int* **2008**; 50:291–4.
261. **Moujaber T**, MacIntyre CR, Backhouse J, Gidding H, Quinn H, Gilbert GL. The seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Australia. *Int J Infect Dis*, **2008**; 12:500–4.
262. **Sasidharan S, Uyub AM**. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among asymptomatic healthy blood donors in Northern Peninsular Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **2009**;103: 395–8.
263. **Tam YH**, Yeung CK, Lee KH, Sihoe JD, Chan KW, Cheung ST, et al. A population-based study of *Helicobacter pylori* infection in Chinese children resident in Hong Kong: prevalence and potential risk factors. *Helicobacter* **2008**; 13:219–24.
264. **Kori M, Goldstein E, Granot E**. *Helicobacter pylori* infection in young children detected by a monoclonal stool antigen immunoassay. *Pediatr Infect Dis J* **2009**; 28:157–9.
265. **Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E**, et al. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult Swedish population: a Kalixanda study report. *Scand J Gastroenterol* **2005**; 40:275–85.
266. **Nuno F Azevedo, Janis Huntington and Karen J. Goodman** The Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications. **2009**, *Helicobacter* 14 (Suppl. 1): 1–7.
267. **Bhuiyan TR**, Qadri F, Saha A, Svennerholm AM. Infection by *Helicobacter Pylori* in Bangladeshi children from birth to two years, relation to blood group, nutritional status, and seasonality. *Pediatr Infect Dis J* **2009**; 28:79–85.
268. **Niv Y**, Hazazi R, Waked A, Lederfein T, Achiel K. *Helicobacter pylori* recurrence and infection rate in Israeli adults. *Dig Dis Sci* **2008**; 53:1211–4.
269. **Us D and Haşcelik G**. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in an asymptomatic Turkish population *Journal of Infection*, Volume 2, **1998**; 37:148-150.
270. **Sandıkçı M, Doran F, Köksal F, Akan E**. *Helicobacter pylori* prevalence in a routine upper gastrointestinal endoscopy population. *BJCP* **1993**; 47:187-189.
271. **Duran Arslan**, Fulya Tahan, Ferunda Demir, İlkay Taşkın, Erciyes Üniversitesi tıp Fakültesi Çocuk polikliniklerine başvuran sağlıklı çocuklarda *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun seroprevelansı ve bunu etkileyen faktörler. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* **2006**;28 (4) 192-196.
272. **Yucel T**, Aygin D, Sen S, Yucel O. The prevalence of *Helicobacter pylori* and related factors among university students in Turkey. *Jpn J Infect Dis* **2008**; 61:179–83.
273. **Brown LM**. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. **2000**; 22:283-297.
274. **Sökücü S**, Sütöğlu Ö, Türkkan E, Elkabes B, Özden T, Saner G. *Helicobacter pylori* infection in Turkish children with gastrointestinal symptoms and evaluation of serology. *Turk J Ped* 2002; 44: 102-108.
275. **Doğancı T**, Kansu A, Doğancı L, Girgin N. *Helicobacter pylori* seroprevalence in children, aged 6 months to 5 years old, in Turkey. *Turk J Gastroenterol* **1998**; 2:138-145.

276. **Ertem D**, Harmancy H, Aygen S, et al. The prevalence and determinants of ***Helicobacter pylori*** infection among healthy children in Turkey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2000**; 31 Suppl 2:216.
277. **Higashi H**, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. 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.
278. **Argent RH**, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **2004**; 127:514–523.
279. **Yamaoka Y**, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* **1998**; 36:2258–2263.
280. **Azuma T**, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M. Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis* **2002**; 186:1621–1630.
281. **Rudi J**, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relation to gastrointestinal disease. *J Gastroenterol* **1999**; 94:1525-31.
282. **Ito, Y**, T Azuma, S Ito, H Miyaji, M Hirai, Y Yamazaki, F Sato, T Kato, Y Kohli, and M Kuriyama. Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35:1710–1714.
283. **Podzorski R P**, Podzorski D S, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2003**; 46:83-8.
284. **Ribeiro ML**, Godoy A P, Benvengo Y H, Mendonca S, Pedrazzoli Jr J. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2003**; 36:181-5.
285. **Kim SY, Woo C W, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB**, et al. Genotyping cagA, vacA subtype, iceA1, and babA of ***Helicobacter pylori*** isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* **2001**; 16:579-84.
286. **Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB** et al. Distribution of vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2002**; 33:173–178.
287. **Sufi HZ Rahman**, M Anisur Rahman, M S Arfin, M Mahbub Alam, T M Bhuiyan, Nasim Ahmed, Shamsun Nahar, M S Hassan. *Helicobacter pylori* Infection and Strain Types in Adult Dyspeptic Patients Undergoing Endoscopy in a Specialized Hospital of Dhaka City. *Bangladesh J Med Microbiol* **2009**; 03 (01):4-9.
288. **Bindayna K, and Al Baker W, and Botta G**. Detection of *Helicobacter pylori* cagA gene in gastric biopsies, clinical isolates and faeces. *India n Journal of Medical Microbiology*, **2006**; 24 (3):195-200.
289. **Bulent Kantarceken** at al. Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol* **2003**; 9(7):1580-1583.
290. **Salih, BA**. et al., A preliminary study on the genetic profile of cag pathogenicity-island and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey, *Infect. Genet. Evol.* **2007**.

291. **Saribasak H**, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**; 42(4):1648- 1651.
292. **Bolek BK, Salih BA, Sander E**. Genotyping of *Helicobacter pylori* strains from gastric biopsies by multiplex polymerase chain reaction. How advantageous is it? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2007**; 67–70.
293. **Aydin F, Kaklikkaya N, Ozgur O, Cubukcu K** et al. Distribution of vacA alleles and cagA status of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. *Clinical Microbiology and Infection*, **2004**; 10(12):1102-4.
294. **Y Erzin**, V Koksall, S Altun, A Dobrucali, M Aslan, S Erdamar, A Dirican and B Kocazeybek. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkish Patients with Dyspepsia. **2006**; *Helicobacter*, 11:574–580.
295. **Nağiyev, T**. Gastroduodenal patolojisi olan hastalardan alınan mide biyopsisi örneklerinde *Helicobacter pylori* prevalansının ve genotiplerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi. **2007**, Adana.
296. **Van Doorn, L J**, C Figueiredo, F Megraud, S Pena, P Midolo, D M Queiroz, F Carneiro, B Vanderborght, M D Pegado, R Sanna, W De Boer, P M Schneeberger, P Correa, E K Ng, J Atherton, M J Blaser, and W G Quint.. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **1999**;116:823–830.
297. **Owen RJ, Xerry J, Peters TM, Teare EL**: Surveillance and clinical relevance of vacA genotypes of *Helicobacter pylori* infecting dyspeptic patients in mid-Essex. *Commun Dis Public Health* **2002**; 5:106-111.
298. **Elviss NC**, Owen RJ, Xerry J, Walker AM, Davies K: *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother* **2004**; 54:435-440.
299. **Mukhopadhyay AK**, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharya SK, Azuma T, Nair GB, Berg DE: Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol* **2000**; 182:3219-3227.
300. **Smith SI**, Kirsch C, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Coker AO, Bayerdoffer E, Miehle S: Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med* **2002**; 51:851-854.
301. **Fischer W, Gebert B, Haas R**: Novel activities of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin from epithelial cells towards the immune system. *Int J Med Microbiol* **2004**; 293:539-547.
302. **Atherton JC**. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* **1997**;40:701-3.
303. **Hocker M, Hohenberger P**. *Helicobacter pylori* virulence factors—one part of a big picture. *Lancet* **2003**;362:1231—3.
304. **Covacci A**, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **1999**;284:1328—33.
305. **Tomasini ML**, Zanussi S, Sozzi M, Tedeschi R, Basaglia G, De Paoli P. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol* **2003**; 41:976-80.

306. **Qiao W**, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, et al. *cagA* and *vacA* genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* **2003**; 9:1762-6.
307. **Van Doorn LJ**, Figueiredo C, Megraud F, Pena AS, Midolo P et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **1999**; 116:823–830.
308. **Lin HJ**, Perng CL, Lo WC, Wu CW. *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *vacA* genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol*, **2004**; 10(17):2493-2497.
309. **Correa P and Schneider BG**. Etiology of Gastric Cancer: What Is New? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **2005**; 14:1865-1868.
310. **Brito CAA, Silva LMB, Juca N, Leal NC** et al. Prevalence of *cagA* and *vacA* Genes in Isolates from Patients with *Helicobacter pylori*-associated Gastroduodenal Diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **2003**; 98(6):817-821.
311. **Wong BC, Yin Y, Berg DE, Xia HH** et al. Distribution of distinct *vacA*, *cagA* and *iceA* alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. *Helicobacter*, **2001**; 6:317–324.
312. **Nimri, LFI Matalka, K Bani-Hani and M Ibrahim**. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. *B.M.C. Gastroenterol.*, **2006**; 6: 27-33.
313. **Al-qabandi, A, AS Mustafa, I Siddique, AK Khajah and JP Madda**, Distribution of *vacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Kuwait. *Acta Trop.*, **2005**;93: 283-288.
314. **Maciorkow E**, I Roszko, O Kowalczyk, M Kaczmarek, L Chyczewski and A Kemonia, The evaluation of *vacA* gene alleles frequency in *Helicobacter pylori* strains in children and adults in Podlaskie region. *Folia. Histochem. Cytobiol.*, **2007**;45(3): 215-219.
315. **Abbas Doosti and Pooria Ghasemi-Dehkordi**. *Helicobacter pylori vacA* genotypes in Shahrekordian (Iran) *H.pylori* positive patients. *Research Journal of Biological Sciences*, **2009**;4(1) 11-15.
316. **Salih, B A** et al., A preliminary study on the genetic profile of *cag pathogenicity-island* and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey, *Infect. Genet. Evol.* Volume 7, Issue 4, July **2007**; Pages 509-512.
317. **Figueiredo C, Machado J C, Pharoah P**, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: An opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **2002**; 94:1680–7.
318. **Manuel R. Amieva and Emad M. El-Omar**. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, **2008**; 134:306–323.
319. **Meenakshi Chakravorty**, Arunima Ghosh, Abhijit Choudhury, Amal Santra, Jobaranjan Hembrum, and Susanta Roychoudhury Interaction Between *IL1B* Gene Promoter Polymorphisms in Determining Susceptibility to *Helicobacter pylori* Associated Duodenal Ulcer. *Human Mutation*, **2006**; 27(5),411-419.
320. **El-Omar EM**. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* **2001**; 48:743–7.
321. **El-Omar EM**. Carrington M, Chow WH, et al. *Interleukin-1* polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **2000**; 404:398–402.

322. **El-Omar EM**, Rabkin CS, Gammon MD, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* **2003**; 124:1193–1201.
323. **Rad R, Prinz C, Neu B**, et al. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and *interleukin-1* polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *J Infect Dis* **2003**; 188:272–81.
324. **Sicinski LA, Lopez-Carrillo L, Camargo MC**, et al. Gastric cancer risk in a Mexican population: Role of *Helicobacter pylori* CagA positive infection and polymorphisms in interleukin-1 and -10 genes. *Int J Cancer* **2006**; 118:649–57.
325. **Machado C, Figueiredo C, Canedo P**, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* **2003**; 125:364–71.
326. **Chen A, Li CN, Hsu PI**, et al. Risks of interleukin-1 genetic polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in the development of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* **2004**; 20:203–11.
327. **Ruzzo A, Graziano F, Pizzagalli F**, et al. *Interleukin 1B* gene (*IL-1B*) and *interleukin 1 receptor antagonist* gene (*IL-1RN*) polymorphisms in *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. *Ann Oncol* **2005**; 16:887–92.
328. **Zeng ZR, Hu PJ, Hu S**, et al. Association of *interleukin 1B* gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* **2003**; 52:1684–1689.
329. **Palli D, Saieva C, Luzzi I**, et al. *Interleukin-1* gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *Am J Gastroenterol* **2005**; 100:1941–1948.
330. **Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P**, et al. *Helicobacter pylori* and *interleukin 1* genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **2002**; 94:1680–1687.
331. **Hivana Patricia Melo Barbosa**, et al. *Interleukin-1* and *TNF-α* polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population. *World J Gastroenterol* **2009**; 15(12): 1465-1471.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Erkan YULA
Doğum Tarih ve Yeri : 16.06.1978
Medeni Durumu : Evli
Adres : Güzelyalı mah. 10.sok. Ekşioğlu apt.Kat:8 No: 16
Seyhan/ADANA
Telefon : 0322 232 42 44
Faks : -
E.posta : erkanyula@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi
Varsa Mezuniyet Derecesi : İyi
Görev Yerleri : Adıyaman, Sincik Merkez Sağlık Ocağı
Ankara, GATA Kan Bankası
Dernek Üyelikleri : Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Ankara Mikrobiyoloji
Derneği, Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği.
Alınan Burslar : Yok
Yabancı Dil(ler) : İngilizce
Diğer Hususlar : -