

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÜST GASTROİNTESTİNAL SİSTEM (GİS)
KARSİNOMALI VE KRONİK GASTRİTLİ HASTA
GASTRİK BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN HAZIRLANMIŞ
PARAFİN BLOK ÖRNEKLERİNDE *H.PYLORI*
PREVALANSI İLE *H.PYLORI* *cagPAI* VE *vacA*
GENOTİPLERİNİN HİSTOPATOLOJİK TANI İLE
KORELASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Dr.Ali BAHADORİ

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Prof. Dr. Mohammad hossein SOMİ**

ADANA-2016

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÜST GASTROİNTESTİNAL SİSTEM (GİS)
KARSİNOMALI VE KRONİK GASTRİTLİ HASTA
GASTRİK BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDEN HAZIRLANMIŞ
PARAFİN BLOK ÖRNEKLERİNDE *H.PYLORI*
PREVALANSI İLE *H.PYLORI* *cagPAI* VE *vacA*
GENOTİPLERİNİN HİSTOPATOLOJİK TANI İLE
KORELASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Dr.Ali BAHADORİ

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Prof. Dr. Mohammad hossein SOMİ**

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 3342 Nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2016

KABUL VE ONAY

**Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“Üst Gastrointestinal Sistem karsinomalı ve Kronik Gastritli Hasta Gastrik Biyopsi
Örneklerinden Hazırlanmış Parafin Blok Örneklerinde H.pylori Prevalansı ile H.pylori
CagPAI ve VacA Genotiplerinin Histopatolojik Tanı ile Korelasyonunun Belirlenmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tarihi: 07 / 06 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Akğün Yaman
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Figen Doran
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Selahattin Çelebi
Atatürk Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Nizami Duran
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca bilgi ve desteği ile hep yanımda olan yaptığım tüm çalışmalarım bana katkıda bulunan tez danışmanlarım Prof. Dr. Fatih Köksal ve Prof. Dr. M.Hossein Somi'ye, tez çalışmam için klinik örneklerimi hazırlanmasında yardımcı olan ve katkı sağlayan Prof. Dr. Figen Doran ve Doç. Dr. A.Taher Eftekhari Sadat' a, Ç.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nde bulunan tüm hocalarıma, tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan arkadaşlarım Suna Kızılyıldırım ve Mahsa Esmailou' ya, biyoinformatik analizlerde katkı sağlayan Maryam Yassi' ye, fakülte sekreterimiz Suna Gökmen' e ve son olarak uzakta olsalarda ilgi ve desteklerini esirgemeyen, İran'da bulunan ailem ve kardeşlerime saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ali BAHADORİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.1.1. <i>H. pylori</i> mikrobiyolojisi	5
2.1.2. Patofizyoloji	6
2.1.2.1. Asidik mide ortamına adaptasyonu	6
2.1.2.2. <i>H. pylori</i> 'nin Virülans Faktörleri	7
2.1.2.2.1. Dış Membran Proteinlerini Kodlayan Genler	8
2.1.2.2.1.1. <i>babA</i>	9
2.2.2.1.2. <i>sabA</i>	9
2.2.2.1.3. <i>oipA</i>	10
2.2.2.1.4. <i>hopQ</i>	10
2.2.2.2. Motilite Genleri	11
2.2.2.2.1. <i>fla</i>	11
2.2.2.2.2. <i>iceA</i>	11
2.2.2.3. Cag Patojenite Adası	11
2.2.2.3.1. Tip IV Sekresyon Sistemi ve Fonksiyonları	13
2.2.2.3.2. <i>cag</i> Patojenite Adalarının Fonksiyonu	15
2.2.4.1. <i>cagA</i>	15
2.2.4.1.1. EPIYA Motifi	17
2.2.4.2. CagM	17
2.2.4.3. <i>cagL</i>	18

2.2.4.4. CagT.....	18
2.2.4.5. <i>cagI</i>	19
2.2.4.6. <i>cagE</i> ve <i>virB11</i> Geni.....	19
2.2.4.7. <i>cagG</i>	19
2.2.5. Vakülizasyon Sitotoksin	19
2.2.5.1. VacA Protein.....	20
2.2.5.2. VacA' nın oligomerik yapısı.....	20
2.2.5.3. Farklı <i>H. pylori</i> suşlarında <i>vacA</i> alleller arasındaki varyasyonlar	22
2.2.5.4. <i>vacA</i> ' nın biyolojik aktivitesi.....	22
2.2.5.5. Vakuolasyon aktivitesi ve <i>cagA</i> arasındaki ilişki	24
2.2.6. <i>H. pylori</i> ' ye Karşı Oluşan İmmun Cevap	24
2.2.6.1. Efektör Hücreler; Makrofajlar.	24
2.2.6.1.1. Makrofaj aracılı apoptosis	27
2.3. Mide kanseri	27
2.3.1. Mide kanseri risk faktörleri.....	28
2.3.1.1. Beslenme ve Diyet.....	28
2.3.2. Mide kanserinin patogenezi.....	29
2.3.2.1. Genetik yatkınlık ve düzensiz meydana gelen mutasyonlar	31
2.3.2.2. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu	32
2.3.3. Mide kanserinin Alt tipleri.....	33
2.3.3.1. Kardia, Non-Kardia ve Korpus	34
2.3.3.2. İntestinal ve Diffüz Tip Mide Kanseri.....	34
2.3.3. <i>Helikobakter pilori</i> ve kanser ilişkisi.....	36
2.3.3.1. Apikal -Junctional Kompleks	38
2.3.3.2. Gastrik Karsinogenesis ilişkili <i>H. Pylori</i> ' nin İnflamasyon ilişkili Mekanizmaları	39
2.3.3.2.1. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu Gastrik Mukozal antijenlere karşı indüklenen antikorlar	40
2.3.4. <i>H. pylori</i> ve Mide Kanserinin Moleküler Patogenezi	41
2.3.5. <i>H. pylori</i> Tanı.....	42
2.3.6. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonu ve Mide Kanserinin Epidemiyolojisi	43
3. GEREÇ ve YÖNTEM	46

3.1. Örneklerin Temini, taşınması ve Saklanması:	46
3.2. Doku örneklerinin bloklardan çıkartılması ve DNA ekstraksiyonu :	47
3.3. Eksrakte DNA'nın saflığının değerlendirilmesi	48
3.4. Hedef Dizilerin PCR ile Analizi	48
3.4.1. PCR ile Amplifikasyon:	48
3.4.2. PCR Ürünlerinin Değerlendirilmesi	50
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Helicobacter pylori</i> mide dokusundaki görüntüsü.....	6
Şekil 2. <i>H. pylori</i> 'nin mide epiteline tutunması	7
Şekil 3. <i>Helicobacter pylori cag</i> patojenik adanın şematik görünümü.	12
Şekil 4. <i>cag</i> patojenite adanın genetik organizasyonu.....	13
Şekil 5. T4SS3-10 kompleksinin asimetrik karma yapısı.....	15
Şekil 6. <i>cagA</i> aktivasyonu, hücre içi aktin yoğunlaşması ve <i>cag</i> translokasyonu	16
Şekil 7. <i>cagA</i> aktivasyonuna yönelik hücrel sinyaller.....	17
Şekil 8. Vakuolasyon sitotoksin geninin şematik görüntüsü	20
Şekil 9. VacA oligomerinin electron mikroskopunda, üç boyutlu üst yüzey görüntüsü	21
Şekil 10. Epitel hücre ile <i>vacA</i> etkileşimi gösteren model	23
Şekil 11. <i>H. pylori</i> 'ye karşı cevaben gelişen makrofaj iNOS sentezinin düzenlenmesi ve NO üretiminin regülasyonu	25
Şekil 12. <i>H. pylori</i> 'nin neden olduğu makrofaj apoptoz mekanizması	27
Şekil 13. Mide kanserinin patogenezi	29
Şekil 14. <i>H. pylori</i> enfeksiyonun gastrik klinikopatolojik sonuçları	30
Şekil 15. Mide kanseri gelişiminde farklı faktörlerin etkisini gösteren şema.	31
Şekil 16. <i>H. pylori</i> ve bazı virülans faktörleri	32
Şekil 17. <i>H. pylori</i> enfeksiyonu ve mide kanseri gelişiminde sorumlu tutulan konak genotipi, çevresel riskleri ve bakteriyel virülans faktörü	33
Şekil 18. Mide anatomisi.....	34
Şekil 19. Orta derecede farklılaşmış adenokarsinom, intestinal tip.....	35
Şekil 20. Az farklılaşmış adenokarsinom; diffüz tip	35
Şekil 21. Akut/kronik gastrit, kronik atrofik gastrit ve intestinal metaplaziden sorumlu olan <i>H. pylori</i> enfeksiyonu.....	36
Şekil 22. Mide kanserine giden Multifaktöriyel yollar.....	37
Şekil 23. <i>H. pylori</i> , inflamasyon ve asit sekresyonu arasındaki ilişkiler.	38
Şekil 24. <i>H. pylori</i> Apikal -Junctional Kompleks düzenin bozulması	39
Şekil 25. <i>H. pylori</i> ve gastrik karsinogenezi bağlayan moleküler yollar.	41
Şekil 26. Global mide kanseri insidansı	44
Şekil 27. <i>glmM</i> 'nin (294 bp) elektroforez sonucu görüntüsü.	52
Şekil 28. <i>H. pylori glmM</i> pozitifliğinin merkez ve hasta gruplarına göre dağılımı	52
Şekil 29. <i>cagA</i> ve <i>vacA</i> pozitifliğinin merkez ve hasta gruplarına göre dağılımı.....	53
Şekil 30. <i>vacAs1</i> 'in (190 bp) elektroforez sonucu görüntüsü	54
Şekil 31. <i>vacAm1</i> 'in (290 bp) elektroforez sonucu görüntüsü.....	54
Şekil 32. a: Tebriz bölgesi aktif kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki <i>vacA</i> genotiplerinin dağılımının karşılaştırılması.	56
Şekil 33. b: Çukurova bölgesi aktif kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki <i>vacA</i> genotiplerinin dağılımının karşılaştırılması.	56
Şekil 34. a: Tebriz bölgesindeki kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki <i>cag</i> -PAI genlerinin dağılımının karşılaştırılması.	58
Şekil 35. b: Çukurova bölgesi kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki <i>cag</i> -PAI genlerinin dağılımının karşılaştırılması.	58
Şekil 36. a: Tebriz bölgesi kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki <i>vacA</i> alleleri ile <i>cag</i> -PAI genlerinin dağılımının karşılaştırılması.	59

Şekil 37. b: Çukurova bölgesi hastalarındaki kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomalı hasta biyopsi örneklerindeki <i>vacA</i> alleleri ile <i>cag</i> -PAI genlerinin dağılımının karşılaştırılması.	59
Şekil 38. <i>H.pylori</i> virülans faktörlerinin aktif kronik gastritli hasta biyopsi örneklerindeki merkezlere göre dağılımı.....	60
Şekil 39. Tebriz ve Çukurova bölgesi gastrik adenokarsinomalı hasta biyopsi örneklerinde ki <i>vacA</i> alleleri ile <i>cag</i> PAI genlerinin dağılımı.	60
Şekil 40 a: Merkez ve hasta grubu farkı gözetmeksizin <i>H.pylori</i> genlerinin ortalama sıklığı.	61
Şekil 41. b: Merkez ve hasta grubu farkı gözetmeksizin <i>H.pylori</i> genlerinin ortalama sıklığı.	61



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Amplifikasyon işlemi için kullanılan primerler ve PCR aşamaları	49
Tablo 2. <i>H. pylori glmM</i> pozitifliğinin merkez ve hasta gruplarına göre dağılımı.	52
Tablo 3. Her iki merkezden temin edilen örneklerden izole edilen <i>cagA</i> ve <i>vacA</i> oranı.....	53
Tablo 4. Her iki merkezden temin edilen örneklerden izole edilen <i>vacA</i> genotiplerinin oranı	55
Tablo 5. <i>cagA</i> ⁺ <i>H. pylori</i> pozitif bulunan biyopsi örneklerindeki <i>vacA</i> allellerinin dağılımı.	55
Tablo 6. <i>cagPIA</i> da kodlanan önemli bazı genlerin örneklerdeki oranları.	57
Tablo 7. Merkezler ve hasta gruplarına göre belirlenen <i>H.pylori</i> genlerinin <i>dağılımı</i>	62



KISALTMALAR

cagPAI	: Cag Patojenite Island
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
FFPE	: Formalinle Fikse edilmiş Parafin Gömülü Dokular
GC	: Guanin-Sitozin
IL-1	: İnterlökin 1
IL-8	: İnterlökin 8
OMP	: Dış Membran Proteini
KAG	: Kronik Atrofik Gastrit
LPS	: Lipopolisakarit
µl	: Mikrolitre
mL	: Miliitre
PA	: Patojenite Adaları
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
vacA	: Vakuolasyon cytotoxinA

ÖZET

Üst Gastrointestinal Sistem (Gis) Karsinomali Ve Kronik Gastritli Hasta Gastrik Biyopsi Örneklerinden Hazırlanmış Parafin Blok Örneklerinde *H.Pylori* Prevalansı İle *H.Pylori Cagpai* Ve *Vaca* Genotiplerinin Histopatolojik Tani İle Korelasyonunun Belirlenmesi

H. pylori Gram negatif, spiral şeklinde, mikroaerofil bir bakteri olup dünya nüfusunun yarısından fazlasının midesinde kolonize olan bir patojendir. Gastrit, gastrik ülser, duodenal ülser, midede adenokarsinoma, mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması (MALT lenfoma) gibi gastritle ilişkili hastalıkların en önemli nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1994 yılında *Helicobacter pylori*' yi birinci grup gastrik kanserojen olarak ilan etmiştir. *H. pylori*' nin neden olduğu kronik gastritin prekanseröz bir patolojisi olduğu bilinmektedir. Kanser oluşumunda *Helicobacter pylori*'ye ait bazı özelliklerin rolü üzerinde önemle durulmaktadır. *Cag* Patojenite Island (*cagPAI*) ve vakuolasyon cytotoxinA (*vacA*) gibi virülans genleri, enfeksiyona neden olan suşun patojenik potansiyeli üzerinde modifiye edici etkiye sahip olabilir.

Bu çalışmada, İran ve Türkiye' deki aktif kronik gastrit ve mide adenokarsinomu ile ilişkili *H. pylori*' nin virulans faktörleriyle ilişkili genlerin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, daha önceki bazı çalışmalarda baz alınan bazı *cagPAI* komponentleri ve *vacA* gen alt tipleri üzerinde duruldu. Amacımıza ulaşmak için, İran ve Türk hastalardan Formalinle fikse edilmiş Parafin Gömülü (FFPD) dokular elde edildi. Suşlardaki *cagA*, *cagE*, *cagT*, *cagG*, *cagM*, *vacA s1a*, *vacA s2*, *vacA m1* ve *vacA m2* genlerinin prevalansı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve spesifik primerler kullanılarak çalışıldı. 320 hastanın %28.43' ünde *H. pylori* tespit edilmiştir. İran ve Türk hastalarında *vacAs1a*, *vacAm2* ve *cagA* genlerinin ortalama prevalansı, % 82,41, % 71,42 ve %69,23 oranında baskın olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, Türk ve İran hastalarında incelenen genlerin aynı olduğu ve *H. pylori* enfeksiyonu dışında konağın genetik yapısı ve beslenme gibi faktörlerin de gastrik kanser oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Ancak kanserle *cagA* genin ilişkisi hasta sayısı artırılırsa, daha anlamlı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Adenokarsinom, *cag PAI*, *H.pylori*. Kronik gastrit, *vacA*

ABSTRACT

Determination Of *H. Pylori* Prevalence And Correlation Between Histopathologic Diagnosis And *H. Pylori* *cag*PAI And *vacA* Genotypes In Paraffin Embedded Biopsy Samples Prepared From Patients With Upper Gastrointestinal (GI) Carcinoma And Chronic Gastritis

H. pylori is a Gram-negative, spiral shaped microaerophile pathogen which is colonized in more than half of the world population's stomach. It is a major cause of gastritis associated disease like gastritis, gastric ulcer, duodenal ulcer, gastric adenocarcinoma, mucosa associated lymphoid tissue lymphoma (MALT lymphoma). *Helicobacter pylori* is a gastric pathogen that colonizes majority of the world's population. World Health Organization classified *Helicobacter pylori* as a first class carcinogen in 1994. Genetic diversity within the virulence genes of bacteria such as Cytotoxin associated gene Pathogenicity Island (*cag*PAI) and vacuolating cytotoxinA (*vacA*) may have a modifying effect on the pathogenic potential of the infecting strain.

This study aimed to investigate which genes can be suggested as potentially related virulence factors for *H. pylori* associated active chronic gastritis and stomach Adenocarcinoma in Iran and Turkey. We focused on some *cag* (PAI) components and *vacA* gene subtypes based on correlations shown in some previous studies. In order to achieve our goal, Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) tissues obtained from Iranian and Turkish patients. The prevalence of the *cagA*, *cagE*, *cagT*, *cagG*, *cagM*, *vacA s1a*, *vacA s2*, *vacA m1* and *vacA m2* genes were studied in these strains by using the polymerase chain reaction (PCR) method and specific primers.

From all of 320 patients, *H. pylori* was detected in 28.43% of patients. We found that *vacAs1a*, *vacAm2* and *cagA* genes with mean prevalence of 82.41%, 71.42% and 69.23% were dominant in Iranian and Turkish patients. In conclusion in Turkish and Iranian population the genes that were studied, was homogeneous and there is no significant differences in bacterial genetic and with the exception of *H. pylori* infection other factors such as host genetics and nourishment play an important role in the formation of gastric cancer. But it is possible that if statistical population increases, the *cagA* gene association with cancer will be meaningful.

Key Words: *cag* PAI, *H.pylori*, *vacA*, Adenocarcinoma, Chronic Gastritis

1. GİRİŞ

Helicobacter pylori (*H.pylori*), dünya nüfusunun yarısından fazlasını enfekte eden, insanlarda mide de non-ülser dispepsiden gastrik adenokarsinomalara kadar geniş bir spektrumda patolojik tablo oluşturmak üzere inflamatuvar cevabı provoke edebilecek güçlü virulans faktörlerine sahip bakteriyel bir patojendir. *H.pylori*'nin gastrik mukozaya kolonizasyonu ve patogeneğinde özellikle hücrede sitotoksik etkiden sorumlu genlerin kodlandığı *cag*-patojenite adası (*cagPAI*), yine gastrik hücrede özellikle nükleusa yakın bölgelerde vakuoller oluşturarak hücreyi apoptoza yönlendiren vakuolizasyon toksini (*vacA*) ve eritrosit yüzey antijenlerine bağlanmada etkili olan kan grubu adezyon proteinleri (*babA*) gibi dezyondan sorumlu bir dizi proteinden oluşan virulans faktörlerinin rol oynadığı ileri sürülmüştür. Patofizyolojik olaylarda kolonizasyon ile aktive olan immünsistem hücreleri ve sekrete ettikleri sitokinler de oldukça önemli rol oynamaktadır. Farklı coğrafi bölgelerde yaşayan hastalardan izole edilen farklı genotiplerle oluşan enfeksiyonların yol açtığı gastrik-patolojilerin şiddeti ve prognozu da farklılıklar gösterebilmektedir. Bu bağlamda son yirmi yıldır *H. pylori* ile mide kanseri arasındaki ilişki yoğun olarak tartışılmış, neden asemptomatik taşıyıcılık? neden gastrik adenokarsinoma? sorularına konak ve bakteriye ait virulans faktörlerinin polimorfizmleri irdelenerek cevap aranmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda Güneydoğu Asya ülkelerinde özellikle gastrik adenokarsinomalı Japon hastalarda gastrik kanserle ilişkilendirilen bazı genotiplerin batı toplumlarındaki asemptomatik taşıyıcılığı tartışmaları ve bu sorulara cevap arayan çalışmaları yoğunlaştırmıştır¹.

H. pylori eradikasyonunun, premalign lezyonları olmayan enfekte kişilerde mide kanseri riskini önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. Randomize prospektif çalışmalar ile de bazı *H. pylori* genotiplerinin gastrik kanserin erken aşamalarında tetikleyici etkiye sahip olduğu, eradikasyonun premalign lezyonları önemli derecede azalttığı, ispatlanmıştır². Kobaylar ile yapılan deneysel çalışmalarda; *H. pylori* eradikasyonunun mide kanserinin ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir^{3, 4}. Bütün bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde; mide kanseri gelişiminde *H. pylori*'nin kesin bir rolü olduğu ve anti-*H. pylori* tedavisinin mide kanseri önlemede etkili olacağı iddia edilmiştir.

Bizim çalışmamızın amacı, İran ve Türkiye' de ki histopatolojik yöntemler ile aktif kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomu tanısı almış hastaların gastrik biyopsi örneklerinde moleküler yöntemler ile tespit edilen *H. pylori* suşlarının bilinen önemli virulans genlerindeki polimorfizmler ile histopatolojik bulgular arasındaki ilişkinin gösterilmesi ve bölgesel farklılıkların genotipler ve histopatolojik değişiklikler üzerindeki potansiyel rolünü tespit edilmesidir. Çalışma sonunda; *H. pylori* suşları arasındaki genetik varyasyonlar ve mide kanseri riski arasındaki ilişki ile kanser gelişimine katkı sağlayan *H. pylori* genleri sorgulanacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

Marshall B ve Warren R 'in 1982 yılında *H. pylori*' yi ülserli mide doku biyopsi örneklerinde göstermesi, gastroenteroloji alanında 20. yy' dan 21. yy' a aktarılan gerçek bir devrimin başlangıcı olmuştur. Mide dokularından spiral bakterilerin varlığının 1870 yılından beri bilinmesine rağmen, bu bakterilerin izole edilememiş olmaları sebebi ile tıbbi önemleri anlaşılamamış, buna karşılık gastroduodenal patolojiler ile stres ve beslenme bozukluğu gibi ekzotik sebepler suçlanmıştır. Warren R. (1979) inflame mide biyopsi örneklerinden hazırlanan boyalı preparatlarda kampilobakter benzeri mikroorganizmaları görmüş daha sonra çalışma arkadaşı Marshall B (1982) ile bu bakteriyi gastrik biyopsi materyallerinden izole etmiştir. Ancak, gastroduodenal patoloji ile bu mikroorganizmalar arasındaki muhtemel etyolojik ilişkiyi ciddi tartışmalara yol açabileceği düşüncesi ile açıklamaktan çekinmişler, bulgularından emin olmak için Koch postülatını gerçekleştirmeye karar vermişlerdir. Bu amaçla Marshall B. (1983) ülserli hastaların gastrik biyopsi örneklerinden izole ettikleri bu bakterileri oral yolla kendisine inoküle ederek, gastrit tablosunun gelişmesini beklemiş, mide ekşimesi ile başlayan yakınmalardan sonra endoskopi ile midesinden aldığı biyopsi örneğinde aynı mikroorganizmaları göstererek potansiyel ilişkiyi ispatlamış ve bu bulgudan sonra keşiflerini bilim dünyası ile paylaşmışlardır. Marshall B. ve Warren R.' e bu buluşlarından dolayı 2005 yılında, Fizyoloji veya Tıp alanında Nobel Ödülü verilmiştir.

Başlangıçta *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırılan ve daha sonra *Campylobacter pylori* olarak isimlendirilen bu bakteriler 16S rRNA yapılarındaki farklılıklar sebebi ile kampilobakter genusundan çıkartılarak *Helicobacter* genusu içerisinde, *Helicobacter pylori* türü olarak yeniden adlandırılmışlardır. *H. pylori*' nin keşifinden sonra, tanı testlerinde sağlanan gelişmeler paralel olarak kısa sürede çok sayıda çalışma yapılmış, bu mikroorganizmaların üst gis patolojilerindeki etyolojik rolü bütün yönleri ile araştırılmaya başlanmıştır. Etkene yönelik antibiyotiklerin de kullanıldığı ülser tedavi protokolleri ile gastroduodenal patolojilerin prognozu hasta lehine düzeltilebilmiştir. Uluslararası Kanseri Araştırmaları alt grubu *H. pylori* gastrik adenokarsinoma ilişkisini gösteren çalışmalara dayanarak bu mikroorganizmayı 1994 yılında Tip I karsinojen olarak tanımlamıştır.

Diğer taraftan *H. pylori* ve histopatolojik bulguların görülmesi, ilgiyi *H. pylori* virülans faktörleri, virülansı kodlayan genler ve bu genlerdeki muhtemel polimorfizmin prognoza olan etkisi üzerine çekmiştir. Antibiyoterapinin beklenen bir sonucu olarak *H. pylori* suşları arasında hızla yayılan antibiyotik direnci, tedavi başarısızlıkları ile sonlanmış, virülans faktörleri polimorfizmine yönelen gen bazlı çalışmalar direnç mekanizmaları ve hızlı direnç tanısında alternatif yaratılması üzerine de yoğunlaşmaya başlamıştır. Günümüzde *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavi başarısı, direnç gelişimi sebebi ile, % 40-50' lere kadar gerilemiştir. *H.pylori'* ye karşı koruyucu immuniteyi sağlayabilecek potent bir aşı henüz geliştirilememiştir. *H. pylori* enfeksiyonları gelişmişliğe paralel olarak küresel anlamda giderek azalıyor olsa da, gelişmekte olan ülkelerdeki insidans ve prevalans oranları hala çok yüksektir. Enfeksiyonların çoğunun genellikle asemptomatik olmasına rağmen, her yıl asemptomatiklerin % 5' in de aktif semptomlar geliştirmekte semptomatik kişilerden de % 1-2'sinde MALT lenfoma ve gastrik adenokanserler gelişebilmektedir. Bu sebeple, enfeksiyonların tedavisi, profilaksi çalışmaları, daha rasyonel tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, epidemiyolojik özellikler ve patogeneze hakkında yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç devam etmektedir ve hala cevaplanması gereken pek çok soru ile optimize edilmesi gereken tanı ve tedavi protokolleri vardır⁵.

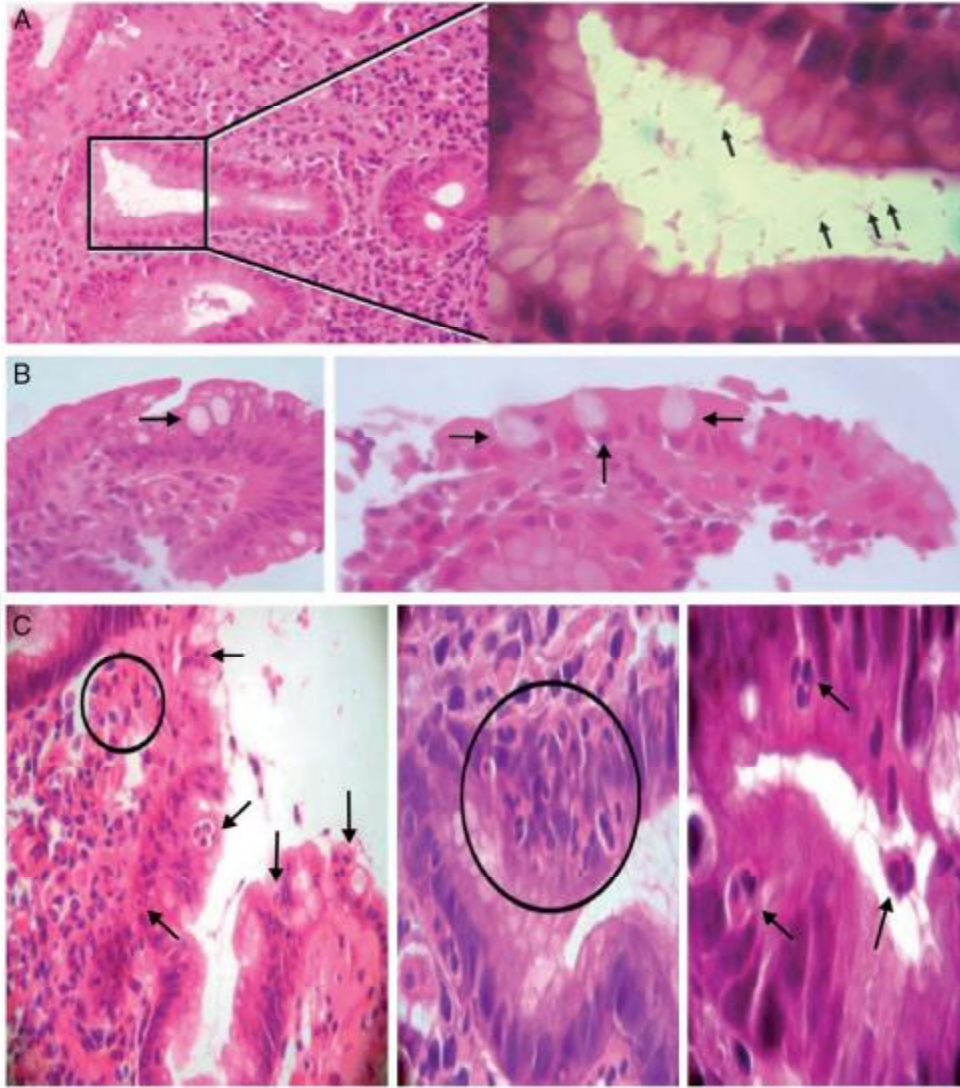
2.1. *Helicobacter pylori*

H. pylori 1982 yılında bir mide biyopsisinden kültürü yapıldığından itibaren yoğun araştırma konusu olmuştur. Gram negatif olan bu bakteriler farmakologlar, patologlar, epidemiyologlar, onkologlar, gastroenterolog, enfeksiyöz hastalık uzmanları ve bakteriyologların ilgisini çekmiş ve birçok araştırmaya konu olmuştur. *H. pylori* veya bir başka bakterinin gastroduodenal patolojiler ile ilişkili olabileceği ve bu bakterinin yol açtığı patolojik değişimlerin zaman içerisinde gastrik adenokarsinomalara öncülük edebileceği ihtimali kabullenilmesi zor bir ihtimaldi. Ancak Marshall B meslektaşlarını ve halkı ikna etmek için, gastritli hastadan izole ettiği *H. pylori* suşu ile hazırladığı süspansiyonu içmiş ve *H. pylori'* nin yutularak çoğu mide hastalıklarının etiyolojik ajanı olduğu fikrini ortaya koymuştur⁵. Correa P, *H. pylori* tarafından indüklenen akut gastrik inflamasyonun persiste eden kolonizasyona bağlı olarak kronik inflamasyona, kronik inflamasyona bağlı olarak azalan asit sekresyonunun asit sekrete

eden hücrelerde atrofiye, yoğun sitokin baskısı ile humoral cevap tarafından eradike edilemeyen *H. pylori*' ye karşı immune cevabın T_2 'den T_1 ' e dönerek hücre yıkımına dönüşeceği, biyolojik saatin bozulması sonucu oluşan neoplastik transformasyonun intestinal tip metaplaziyle sonlanacağı yani gastrik kansere ilerleyebileceği fikrini öne sürmüştür⁴. *H. pylori* hastaların çoğunda gastrik mukozanın kronik inflamasyonuna sebep olur. Gastrik kanser vakalarında sürvey beş yıldan az olduğu için, bu hastalarda erken teşhis ve bağlı olarak tedaviye erken başlanması önemli olup her türlü prediktiv bulgu hastalığın prognozu için önemlidir.

2.1.1. *H. pylori* mikrobiyolojisi

H. pylori 0.5 µm capında yaklaşık 3µm uzunluğunda S harfi, spiral veya heliks şeklinde gram negatif bir bakteridir. Mikroaerofilik, kapnofilik, olan bu mikroorganizmalar ancak düşük oksijen konsantrasyonuna sahip atmosferde yaşayabilirler. Enerji temininde alternatif olarak, sahip oldukları hidrojenaz enzimi yardımı ile, bağırsak bakterileri tarafından üretilen hidrojeni de oksitleyerek kullanabilirler⁶. Oksidaz, katalaz ve üreaz enzimlerine sahiptirler. Sıvı ve uygunsuz ortamlarda biyofilm oluşturur ve kültürde üretilmeyen kokoid forma dönüşebilirler⁷. Her iki formda *H. pylori*'nin gastrik mukozadaki persisten kolonizasyonu için önemlidir. *H. pylori* beş majör dış membran protein ailesine ait proteinlere sahiptir⁸. Bu proteinlerden ilki farazi adezin proteinleri olup gastrik hücre yüzeyine bağlanmadan sorumludur. Diğer membran proteinleri de; porin proteinleri, sideroforlar, flagella proteinleri ve fonksiyonu bilinmeyen proteinler olarak dört farklı aileye mensup proteinlerdir. Bütün Gram negatif bakterilerin dış membranlarında olduğu gibi, *H. pylori* dış membranında da, aksesuar protein komponentler dışında, ana omurga fosfolipid ve lipopolisakaritlerden (LPS) oluşur. LPS bakteriye somatic O antijeni özelliği kazandırır. Fukozillenebien bu antijenik polisakaritler mide epitelinde bulunan Lewis kan grubu antijenleri ile homolog özellik gösterebilir⁹. Ayrıca dış membranda az sayıdaki bakteride de bulunan glikozillenmiş kolesterol rezidüleri yer alır. *H. pylori* bir uçta toplanmış, sayıları 4 ila 6 arasında değişen, uçları topaç başını andırır flajellaya sahiptir. Bu flagellar yapı gastrik ve enterohepatik helikobakter türlerine mide mukusu içerisinde oldukça hızlı hareket yeteneği kazandırır¹⁰. Helikobakterin karakteristik flajellar filamanları, FlaA ve FlaB olarak adlandırılan iki kopolimerize flajellinden oluşmaktadır.



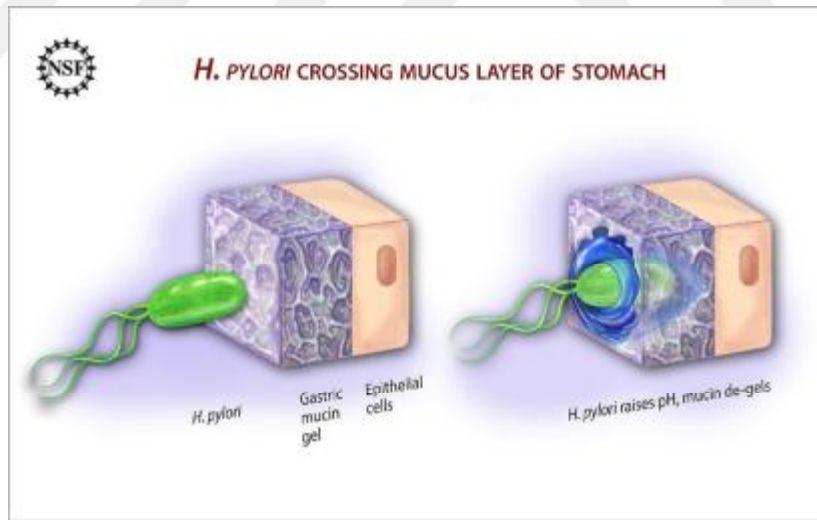
Şekil 1. A) *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu kronik atrofik gastrit glandular lümendeki görünümü B) İntestinal metaplazi C) Lamina propria' da infiltrate inflamatuvar polimorf nötrofillerin varlığı¹¹.

2.1.2. Patofizyoloji

2.1.2.1 Asidik mide ortamına adaptasyonu

H. pylori enfeksiyonu gastrik asit sekresyonunun üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve mide mukozasına zarar verir. Mide asidi sekrete eden kısım; distal mide veya korpus, asit sekresyon hücreleri olmayan ya da az sayıda olan; antrum kısmına göre ayrılabilir. *H. pylori* midenin bütün kompartmanlarında mukozal yüzeye adheze olabilir. Fakat bu bakterilerin mukozal epitel ve dolayısı ile konak immunc cevabı ile etkileşimleri

topografik olarak farklılık gösterebilir¹¹. Antrumdaki doku hasarının şiddeti lezyonun yerleşimine bakılmaksızın her zaman eşit olup, korpus mukozasında görülen hasara göre çok daha şiddetlidir. Yüksek seviyelerde asit salgılanması hafif korpus inflamasyonu ve korpustaki düşük *H. pylori* yoğunluğu ile ilişkilidir. Tipik duodenum ülserli hastalarda bu ilişki korpus paternli ya da predominant antral gastritler olarak adlandırılmıştır. Asit sekresyonunu inhibe eden proton pompa inhibitörleri gibi ilaçların kullanılması veya alkali diyet gibi sebepler ile azalan asit sekresyonu aslında *H. pylori* ile mukozanın etkileşimine izin verir, korpus inflamasyonunda artış sağlar¹². Korpusta azalan asit sekresyonunun; inflamasyon, interlökin 1 (IL-1) sitokin üretimi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunda intragastrik asit pH' nın 3' ün altına düşmesi gibi asit sekresyonun inhibisyon refleksinin azalmasından dolayı yemeklerden sonra uzun süreli asit sekresyonu ile asit sekresyonunun reversibl anormallikleri vardır¹³. Enfeksiyon eradikasyonu, normal inhibitör yollarla ve gastrit modeline bağlı olarak asit salgılanması üzerinde başka etkilerle sağlanabilir.¹⁴



Şekil 2. *H. pylori*'nin mide epiteline tutunması

2.1.2.2. *H. pylori*'nin Virülans Faktörleri

H. pylori enfeksiyonu suşların virulansına bağlıdır. *H. pylori*, yanlış eşlenen DNA segmentlerinden kaynaklanan mutasyonlar, intra-inter genomik rekombinasyonlar, doğal transformasyonlarla ve sık mutasyonlar ile büyük genetik

çeşitlilik gösterir. *H. pylori* enfeksiyonlarına spiral şekli, üreaz, hareket, lipopolisakarit ile dış membran adezinleri katkı sağlar. *H. pylori* genetik çeşitliliği ve uyarılmış bağışıklık, kronik enfeksiyona katkıda bulunur. Virülans faktörlerinin prevalansı hastalık, etnik köken, yaş ve ülkeye göre değişir¹⁵. *H. pylori* *VacA*; vakuolleşme, por oluşumu, endo-lizozomal aktivitenin bozulması, gastrik hücrelerin apoptozu ve immünmodülasyona neden olur. *CagA* onkoproteini proto-onkogen aktivasyonu, interlökin8 (IL-8) salınımı, hücre proliferasyonu ve apoptosis, kromozomal instabilite, morfolojiyi ve hücre sinyal yollarını değiştirir. EPIYA *CagA* tip D ve C repeatlerinin artan sayısı, yüksek riskli mide kanseri ve SHP-2 fosfataz aktivitesinin artışıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Doğu Asya' daki suşların tamamı intakt yani değişmemiş **CagA** protein taşıyan, yüksek virulanslı suşlardır. *cagA* ve *vacA* *s1/i1/m1* tipi de doğu Asya'daki yüksek mide kanseri insidansını açıklamaya yardımcı olabilir. Enfeksiyon *cagA*, *cagPAI* ve *vacA* ile güçlü bir ilişki olduğu göstermiş olsa da, özellikle Batı ülkelerinde *dupA*, *oipA*, *iceA*, *homB*, *babA*, *sabA*, *hopQ* enfeksiyonu patogenezinde için çok önemli gibi görünmektedir^{16, 17}. Tıpa proteini, HP-NAP, ısı-şok proteinleri, LPS ve toll-like reseptörlerle etkileşim enfeksiyonun seyrini etkiler. *H. pylori*' nin virülans faktörlerinin kompleks ve koordineli etkileşimiyle, değişen ortama adapte olabilir ve gastrik inflamasyonu artırabilirler. Ayrıca virülans genlerinin mikro evrimi yılda bir hastada ortaya çıkmaktadır. Kısacası, *H. pylori* virülans faktörlerinin doğrudan etkileri ve kronik gastrik inflamasyon, peptik ülser ya da kanser gelişimine yol açabilir. Virülen suşların bir ülke ya da bölgede tespiti, hastalarda agresif eradikasyon stratejilerini ima etmek, lokal tanı markırları seçmek, yeni ajanlar ve enfeksiyonun kontrolünde geliştirilmiş rejimleri sağlamak için, bazı virülans faktörlerinin klinik önemini ve aralarındaki etkileşimi açıklamak önemlidir^{18, 19}.

2.1.2.2.1. Dış Membran Proteinlerini Kodlayan Genler

H. pylori genomunun yaklaşık % 4' ü dış membran proteinlerini (OMP) kodlayıp bu proteinler 5 major aile altında gruplandırılmıştır²⁰. *Helicobacter* dış membran proteinler ailesi *BabA* (*HopS*), *SabA* (*HopP*), *OipA* (*HopH*) ve *HopQ* adezinlerini içerir. *H. pylori*' nin gastrik mukozaya aderensi, kolonizasyonu ve gastrik mukozada uzun süreli persiste kalması inflamatuvar yanıtın yoğunluğunda önemli roller oynar²¹.

2.1.2.1.1. *babA*

Kan grubu antijenlerini bağlayan adezin olarak bilinen *babA*, 78 kDa büyüklüğünde olup *babA2* tarafından kodlanmaktadır. Gastrik epitel yüzeyindeki glikoprotein yapıdaki Lewis antijenlerinin fukozillenmiş epitoplarına bağlanan *H. pylori*'nin en iyi tanımlanmış dış membran proteindir^{22, 23}. *babA1*, *babA2* ve *babB* olmak üzere üç *bab* alelli tespit edilmesine rağmen ancak *babA2* fonksiyonel olarak aktiftir²⁴. Dünya genelinde *H. pylori* suşlarının tutunma karakterleri analiz edilmiş ve *babA* *H. pylori*'nin konağa adaptasyonu ve kalıcı persiste kolonizasyonu sağladığı öne sürülmüştür²⁵. Bazı araştırmacılar *babA2*'nin duodenal ülser ve adenokanser riskinin arttırdığını ve *cagA* ve *vacA* *s1* allelleri ile birlikte daha ciddi hastalıklara yol açabildiğini bildirilmişlerdir^{26, 27}. *babA* lewis antijenlerine bağlanarak konak hücreindeki çift iplikli DNA' da kırılmalara neden olur ve kanserle ilişkili gen mutasyonunu teşvik edebilir²⁸. *babA*'nın aderensi ayrıca konak hücrelerle bağlantılı tip IV sekresyon sistemini artırarak güçlü inflamatuvar cevabın oluşmasına izin verir²⁹. Bu yüzden *babA* sadece mide yüzeyine tutunmada önemli değil aynı zamanda bakteriyel sekresyon sistemleriyle konak hücrelerine tutunarak hücre sitozolüne bakteriyel faktörlerini de enjekte edebilir.

2.2.2.1.2. *sabA*

sabA, *hopP* veya *OMP17* sialik asit bağlayan adhezinler, 70 KDa büyüklüğünde olup inflame gastrik dokulardan ekspre edilir ve sialil-Lewis antijenlerine bağlanan, *H. pylori*'nin en iyi tanımlanan ikinci adhezinidir³⁰. *H. pylori*'nin *sabA* ligandının ekspresyonu düzenleyen sialil-dimerik-Lex, gastrik hücrelerde Lewis antijenlerinin biyosentezinde yer alan glikosiltransferazın β 3GlcNAc T5 (β 3GnT5) indüklenmesiyle sağlanır, böylece başarılı kolonizasyonu ulaşmak için epitele tutunma güçlendirilir³¹. *sabA* ekspresyonu transkripsiyonel seviyede bazı mekanizmalarla regüle edilebilir. Aslında *sabA* regülasyonu 5' kodlama bölgesinde tekrarlanan CT dinükleotidlerinin, iplik kayması tamir mekanizması yoluyla olmaktadır ve *sabA* promoter bölge değişken homopolimerik timidin yolu vasıtasıyla transkripsiyonel aktivite gösterir^{32,33}. *sabA* ekspresyonun artması veya azalması, midedeki değişikliklere bağlıdır³⁴. *sabA* pozitif durumu, mide asit salgılaması yeteneği ile ilişkilidir. *sabA* ekspresyonu, atrofik mukozada eksprese edilen antijenler veya asit sekresyonunda ki değişiklikler

tarafından regüle edilebilir^{25, 35}. *sabA* pozitif durum intestinal metaplazi, gastrik atrofi ve mide kanseri gelişimi ile ilişkilidir²⁶. *H. pylori* gastiriti indükledikten sonra gastrik mukoza içerisine monosit ve nötrofil infiltrasyonu olur. Opsonize olmayan *sabA H. pylori* suşları siyalize karbonhidrat ile nötrofile bağlanır ve uyarılan nötrofil reaktif oksijen üreterek gastrik epitelin oksidatif hasarına yol açar^{35, 36}.

2.2.2.1.3. *oipA*

Dış membran proteinlerden biri olan **OipA** 34 kDa büyüklüğünde olup 2000 yılında tanımlanmıştır. *H. pylori* kromozomunda *cag*-PAI' den yaklaşık 100 kbp yer alıp adezyonda görev alır^{37, 38 and 39}. OipA regülasyonu 5' kodlama bölgesinde tekrarlanan CT dinükleotidlerinin artışı olarak bilinen yanlış çiftlenen ipler yoluyla olmaktadır (switch "on" fonksiyonel *OipA*; switch "off" nonfonksiyonel *OipA*)⁴⁰. Fonksiyonel *OipA* *cag* PAI, *vacA*, *iceA* ve *babA* gibi virülans faktörleriyle de ilişkili bulunmuştur³³. Fonksiyonel *OipA* yüksek interlökin 8 seviyesi ve nötrofil infiltrasyonu, *H. pylori* yoğunluğu, düedonal ülser ve gastrik kanser gibi birçok ciddi gastrik hastalıklarla önemli derecede ilişkilidir⁴¹. Araştırmacılar *OipA*' nın *cag*PAI ile etkışerek çoklu sinyallerin fosforilasyonu ile aktin dinamiğini etkilediğini ve infamasyonu tetiklediğini göstermişlerdir^{42, 43}. Gastrik karsinogenesis ile ilişkili *H. pylori*-inflatuvar sinyali, fosfoinozit-3 kinaz/Aktin sinyal yollarını aktive eder⁴⁴. *OipA* PI3K / Akt yoluyla, IL-8 salgılanmasını regüle eder ve bu regülasyon faktör O 1/3a transkripsiyonunun inaktivasyonuna bağlıdır⁴⁵. *oipA*' nın inaktivasyonu Afrika ve Asya'da bulunan bir fare türünde kanser insidansının azaldığı ve ayrıca invitroda nükleer β -catenin seviyesinin azaldığı ve bu dış membran proteinin *H. pylori* virülansında önemli olduğu sonucuna varılmıştır⁴⁶.

2.2.2.1.4. *hopQ*

HopQ dış membran proteinlerinden olup *HopQ* tarafından kodlanır ve gastrik epitel hücrelerine tutunarak midede uzun süreli persiste ve kolonizasyonda önemli bir rol oynayabilirler^{47, 48, 49 and 50}.

2.2.2.2. Motilite Genleri

2.2.2.2.1. *fla*

H. pylori'nin hareketliliğini sağlayan flajella, unipolar kılıflı 3-5 adet bulunan, bazal vücut, kanca ve filament olmak üzere 3 yapısal öğelerden oluşmaktadır^{33, 51}. Major FlaA ve minor FlaB iki flajellinden oluşan yapının tabandan döndürüldüğünde filament hareketleri bir pervane şeklinde oluşur⁵². *flaA* genin mutasyonu in vitroda hareketin azalması, flajelin kesilmesine ve hareket kaybına neden olur^{53,54,55}. Motilite mikroorganizmanın mukusu geçerek mukozaya ulaşmasını sağladığı için en önemli virulans faktörleri arasında sayılır.

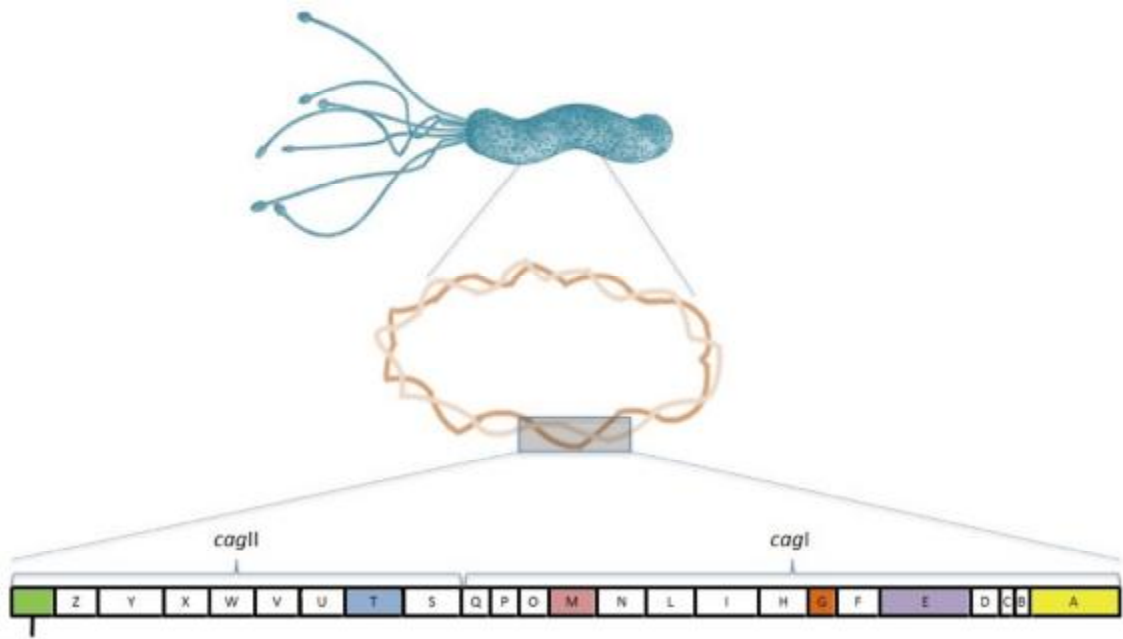
2.2.2.2.2. *iceA*

Son zamanlarda bir diğer virulans geni olan, epitel ile temasta indüklenen *iceA* geni tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda *iceA*'nın *iceA1* ve *iceA2* olarak tanımlanan iki alellelik varyantının olduğu ileri sürülmüş, fakat bu varyantlar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır^{56, 57}. *iceA1*, CTAG-spesifik restriksiyon endonukleazı kodlayan *Neisseria lactamica*'nin *nlIIIIR* gen bölgesinde gösterilmiştir⁵⁸. *iceA1*'in ekspresyonu *H. pylori* ve insan epitel hücreleri arasındaki temasla upregüle olur ve *iceA1* genotipi *iceA1* genotipi akut antral inflamasyon ve artırılmış mukozal interlökin-8 ekspresyonu ile bağlantılıdır⁵⁹. *iceA1* varyantı peptik ülserle, *iceA2* varyantı ise gastritlerle ilişkilidir³³. Mesela Brezilya'da *iceA1* alleli gastritlerle ilişkili bulunmuştur⁶⁰. Ayrıca, Küba, Avrupa, Suudi Arabistan ve Türkiye'de *iceA2* alleli non-peptik ülser dispepsi yanı sıra daha virulan suşları ile ilişkili olduğu görülmüştür³³. Bu nedenle, *iceA* gastroduodenal hastalıkları olan hastalarda marker olarak kabul edilebilir.

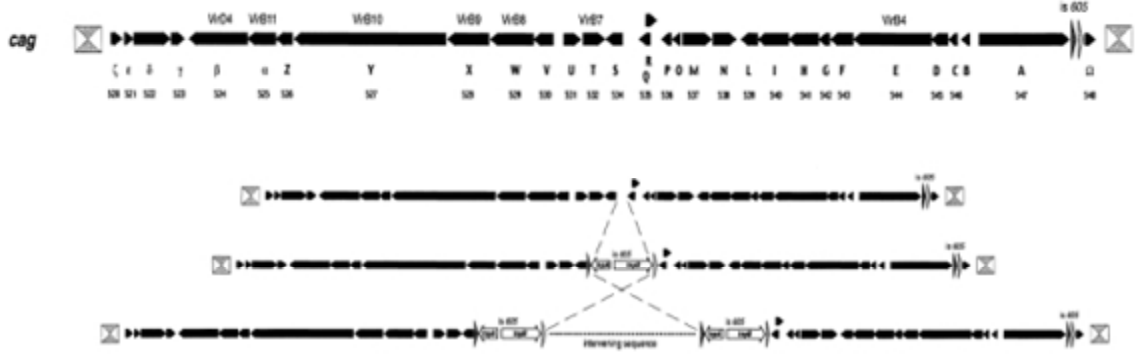
2.2.2.3. Cag Patojenite Adası

Kommensal bir bakteri yaşadığı mikroçevre şartlarına bağlı olarak zamanla patojen bir bakteriye dönüşebilir. Bakteriyel gelişim sadece sürekli bir süreç değildir aynı zamanda horizantal transfer prosesi ile DNA segmentlerini kazanma yolu ile de oluşabilir^{21, 22, 23 and 61}. Bu kazanım homolog rekombinasyon ile, büyük plazmidlerin alınması ile, kromozom içine transpozonlar yolu ile gen insersiyonu ile veya bir faj aracılığı ile bilinmeyen bir kaynaktan gelen DNA'nın insersiyonu yolu ile

olabilmektedir. Yeni entegre DNA blokları olarak belirlenen bu "adalar" hücreye house-keeping genler dışında fenotipi etkileyen ve genellikle olumsuz bir şarta cevap olmak üzere, spesifik adezinler veya metabolik enzimler, demir-uptake sistemleri, konak hücre gen ekspresyonunu ve hücre içi sinyal yollarını etkileyen efektörler gibi çeşitli fonksiyonları kodlamaktadır. Patojenite adaları (PAI) yabancı kaynaklardan köken alan kodon kullanımı ve sıradışı GC içeriği ile tanınır. PAI' nın diğer özellikleri, instabiliteleri, spesifik bir lokusun entegrasyonu (örneğin, tRNA genleri) ve komşu bölgelerde tekrarlanan bölge (direct repeat) varlığıdır. *H. pylori* ile ilişkili hastalıklarda *cagPA* fonksiyonu 1993' te keşfinden bu yana tartışma konusu olmuştur. Farklı sonuçlar ile klinik çalışmalarda *cag*-PAI varlığı peptik ülser hastalığı veya gastrik kanseri ile bağlantılı olup olmadığını test etmek için yapılmıştır. Genellikle bu çalışmalar PCR bazlı *cagA* amplifikasyonu dayandırılmış, *cagA*, *cagPAI* için bir marker olarak kullanılmıştır. İlginç bir şekilde, kronik aktif gastrit, peptik ülser, mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması, *cagA* içeren gastrik kanser de dahil olmak üzere ciddi mide hastalıkları olan hastalardan alınan biyopsilerde, hastalıklar ile *cagA* varlığının doğrudan ilişkisi % 90' dan daha fazla vakada gösterilmiştir⁶². *cagA*' nın konak hücreye transferi *cagPAI* tarafından kodlanan TipIV sekresyon sistemi yardımı ile olur. *cagPAI* *cagI* ve *cagII* olmak üzere iki sub-bölgeye ayrılır. *cagII* daha az virulan, *cagI* ise daha virulandır^{63, 64, 65}.



Şekil 3. *Helicobacter pylori* cag patojenik adanın şematik görünümü.



Şekil 4. *cag* patojenite adanın genetik organizasyonu⁶⁶

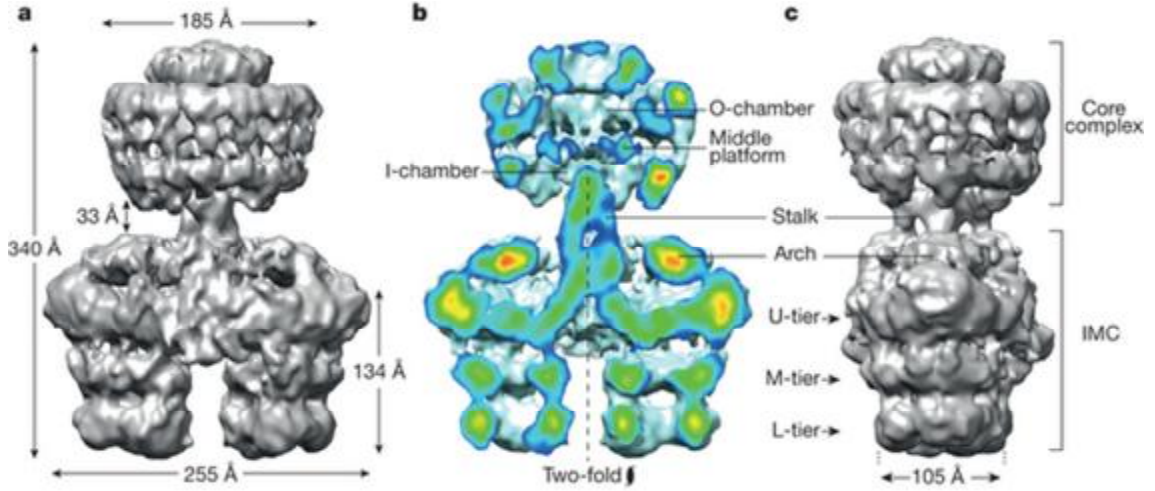
cag bölgesinde 31 open reading bölgesi vardır. Bu bölgelerden biri patojenite adasının 3' bölgesinde olup immünodominant **CagA** antijenini kodlar⁶⁷. **CagA** ilk tanımlanan proteindir ve en virulan olanıdır⁶². **CagA**'nın moleküler büyüklüğü değişkendir ve çeşitli türlerde tekrarlanan motiflere bağlıdır. *cag* PAI, **CagA**'nın yanı sıra tip IV sekresyon sistemini de kodlar⁶⁸.

2.2.2.3.1 Tip IV Sekresyon Sistemi ve Fonksiyonları

Son on yıl içinde mikrobiyal patogenezinde en heyecan verici araştırma alanlarından biri de tip III sekresyon sistemlerinin (T3SS) keşfi olmuştur. Salmonella, Yersinia, ve Shigella türlerinin dahil olmak üzere birçok gram-negatif patojenler, patojenik *E.coli* ve birçok bitki patojenleri doğrudan konakçı hücreye bakteriyel sitoplazmada bakteriyel virülans proteinleri vermek için T3SS kullanır^{69, 70}. Konak hücre içerisine virülans proteinlerini transloke edebilen bir diğer sistem Tip IV Sekresyon Sistemidir (T4SS). İki sistemin evrimsel kökeni farklı olduğunu belirtmek önemlidir. T3SS muhtemelen flajella sisteminden gelişmişken⁷¹, T4SS konjugatif aparatlardan köken almıştır^{72, 73, 74}. Flajella hareket organelleri iken konjugasyon sistemleri bakteriler arasındaki DNA alışverişini sağlar. Bununla birlikte, her iki sistem de aynı zamanda ortak önemli özelliklere sahiptir. Her iki sistemin konakçı hücrenin sitoplazmasına iç ve dış bakteriyel zarlar yoluyla doğrudan kompleks kanal yapısı boyunca proteinleri taşıdığı düşünülmektedir. Ayrıca, şaperon veya şaperon molekülleri gibi stabilize efektörler kullanılır ve ATP-hidroliz için proteini enerji kaynağı olarak kullanılır. Efektörler olarak adlandırılan dışarıya aktarılan bu moleküller, konakçı

hücresinin çeşitli temel sinyal yollarını engeller. Etkörler belirli türlerdir. Sekresyon sistemi ve çeşitli substratları T4SS'inden daha farklıdır⁷⁵. T3SS sadece monomerik proteinleri dışa aktarırken, T4SS'inden birden fazla alt ve nükleoprotein komplekslerini aktarabilir. Günümüze kadar, T4SS'ni kodlayan patojen grup beş türde tanımlanmıştır: *A. tumefaciens* (*virB* and *virD4*), *B. pertussis* (*ptl*), *L. pneumophila* (*icm/dot*), *B. suis* (*virB*), ve *H. pylori* (*cag*). Patogenez için muhtemel öneme sahip tip IV sekresyon sistemleri *R. prowazekii*⁷⁶, *B. henselae*, ve *A. actinomycetemcomitans* türlerinin genomunda da tespit edilmiştir. **Vir** homologları temel olarak farklı patojenlerin sekresyon aparatının yapısal çekirdeğinde de yer almaktadır. Sekresyon sistemindeki **Vir** homologlarının lokalizasyonu *A. tumefaciens* üzerinde yapılan kapsamlı bir çalışmada açıklanmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda **Vir** proteinleri çeşitli sınıflara ayrılmıştır. Bu proteinlerden **VirD4**, **VirB4**, ve **VirB11** homologları bakterinin iç membranında yer alırlar ve ATPaz aktivitesi olan proteinleri kodlarlar. **VirD4**'ün aynı zamanda protein-protein etkileşimini sağladığı da düşünülmektedir. Transglikozidler olarak da tanımlanan **VirB1** homologları, bakteri yüzeyindeki pilusları bir araya getirerek murein tabakasında delikler oluşturmaya yol açarlar. **VirB9** ile ilişkili **VirB7** lipoproteinleri sistemin periplazmik alandaki parçasını oluşturur. **VirD2** şaperon proteini olarak **VirD1** ise substratları stabilize eden ve bağlayan sitoplazmik şaperonlar olarak fonksiyon görürler. **VirB2** pilus subunit olup translokasyon için substratları tanırlar⁷⁷. T4SS' nin *Agrobacterium* sp. düşük bir sıcaklıkta ve fenolik bileşikler ile indüksiyondan sonra, bakteriyel yüzey üzerinde olduğu tespit edilmiştir⁷⁸. *B. pertussis* T4SS kullanarak 5 farklı subunit pertussis toksini salgılar⁷⁹. Toksin epitel yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve daha sonra yerleşir. **VirB2** homolog içeren **VirB** proteinlerinin çoğu homologları, son zamanlarda *B. suis*' te keşfedilmiştir. Yapılan bir çalışmada in vitroda insan makrofajı ile enjeksiyon modelinde, *virB5*, *virB9*, veya *virB10* mutantlarının azaldığı tespit edilmiştir. *virB* bölgesinin *B. suis* hücre içi yaşam ve çoğalması için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. *H. pylori*' de **VirB** ve **VirD4**' ün birçok homoloğu mevcuttur. **VirB4** (**CagE**) ve **VirB11** (**HP525**) substratları ve *CagA*'nın transportu için gerekli enerjiyi sağlayan ATPaz ihtiva eder. **VirD4** (**HP 524**)' nin iç membrana lokalize ve substrat tanıma fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. **VirB7** (**CagT**) ve **VirB9** (**HP528**) ise muhtemelen dış membranda bulunur. **CagM**, **VirB7**' yi

stabilize eden şaperon benzeri fonksiyona sahip bir protein olabilir⁸⁰. **VirB8** ve **VirB10** muhtemelen kanal yapısının bir parçasıdır.



Şekil 5. T4SS3-10 kompleksinin asimetrik karma yapısı⁸¹.

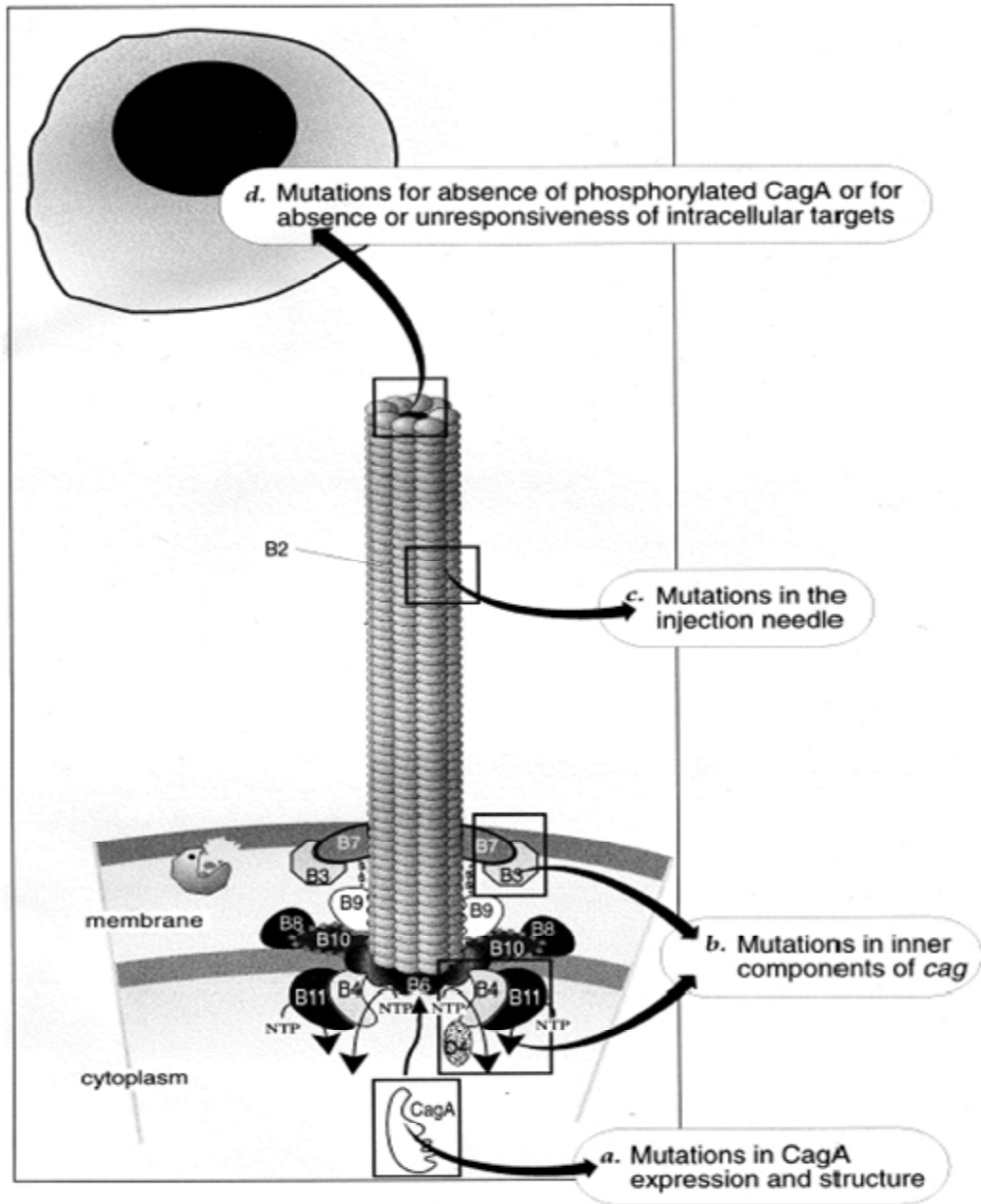
2.2.2.3.2. *cag* Patojenite Adalarının Fonksiyonu

cag PAI' nin genetik analiziyle Tip IV sekresyon sisteminin varlığı öne sürülmüştür ve Tip IV sekresyon sisteminin, muhtemelen *H. pylori*' nin virülansına katkı sağlayarak sinyal iletimini indüklediği ve konak hücreye temasta aracılık ettiği tahmin edilmektedir. Araştırmacılar *H. pylori* ile indüklenen iki temel *cag* aracılı konak hücre sinyal yollarının arasında ayrımını araştırmışlar. Bunlardan biri, *H. pylori*, *cagA* proteinin immünodominant antijenler ile indüklenirken diğeri de *cagA* bağımsız olduğunu tespit etmişlerdir. Dekonvolüsyon mikroskopisi, mutasyon analizi ve biyokimyasal fraksiyon deneyleri konak hücreler içine *H. pylori*' nin adherensi ile *cagA* translokasyonu fonksiyonel tip IV sekresyon sistemine bağlı olduğunu kanıtlamışlardır⁸².

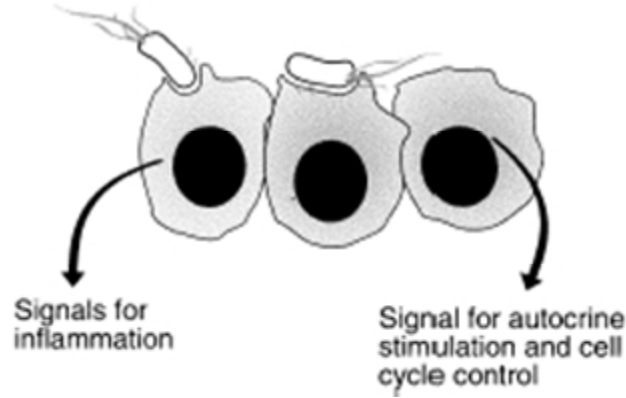
2.2.4.1 *cagA*

Konak hücre içinde, *cagA* henüz tanımlanmamış konak hücre kinaz tarafından bir tirozin rezidüsü ile fosforlanır. c-Src ve basit konak hücre lizatları, in vitro olarak *cagA* tirozin fosforilasyon mümkün olsa da, in vivo koşullarda bu bulgunun önemi belirsiz kalmaktadır⁸³. Hücre fraksiyonasyonları, intraselüler *cagA*' nın büyük

çoğunluğu çözünmeyen fraksiyonda bulunduğunu, önemli bir kısmında konak hücre membranıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, tirozin rezidülerinin fosforilasyonu sonrasında *cagA* konak hücre içinde çözünmeyen ve belki de membrana bağlı kompleks haline geldiğini düşündürmektedir. *cagA*'nın tirozin fosforilasyonu, proteinin karboksi terminal değişken ucundaki tirozin fosforilasyon motifinde gerçekleşmektedir. EPIYA karboksi terminal değişken ucundaki tekrar bölgesi içinde 102 bp ilerisinde yer almaktadır.



Şekil 6. *cagA* aktivasyonu, hücre içi aktin yoğunlaşması ve *cag* translokasyonu



Şekil 7. *cagA* aktivasyonuna yönelik hücresel sinyaller

2.2.4.1.1 EPIYA Motifi

Epiya motifi, memeli hücrelerinde *Helicobacter pylori* virülans faktörü *cagA*'nın membran bağlı sinyal sistemidir. Konak hücresi içerisine transloke olan *cagA*'nın tirozin fosforilasyonu Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala aminoasit dizilerinin yer aldığı EPIYA motifinde gerçekleşmektedir ve fosforilasyon için *cagA*'nın SHP-2'ye bağlanması gerekmektedir. *cagA*'nın patojenik aktivitesi için *cagA* membran bağlantısı önemli bir unsurdur⁸³. EPIYA motifleri karboksi terminal değişken ucundaki farklı amino asit dizilerine göre EPIYA A, B, C ve D olarak tanımlanmaktadır^{84, 85 and 86}. EPIYA-A ve EPIYA-B motifleri dünya genelinde suşlarda yer alırken, EPIYA-C sadece Batı ülkelerde ki (Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya) suşlarda bulunur. EPIYA-C bölgelerinin sayısı değişebilir; Bununla birlikte, çoğu **CagA** proteinler tek EPIYA-C bölgesi (A-B-C tipi) içerir ve EPIYA-A ve EPIYA-B bölgeleri EPIYA-C bölgelerinden daha az ölçüde fosforile edilir. Batı suşlarında *cagA* EPIYA-C bölgelerinin sayısında ki artış mide kanserine yakalanma riskinde önemli bir gösterge olduğu tespit edilmiştir. EPIYA-D motifi Doğu Asya (Japonya, Güney Kore ve Çin) suşlarında bulunmuştur ve Batı *cagA* (A-B-C tip) bulunan suşlara göre gastrik epitel hücrelerden daha fazla IL-8 sekresyonunu arttırdığı görülmüştür⁸⁵.

2.2.4.2 CagM

H. pylori cagM, *cagA* translokasyonu için gerekli olup transmembran kanalda bulunur. *cagM* *cag* bölgesinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir⁸⁷. Bazı çalışmalarda, bu gen tarafından kodlanan protein, interlökin-8 aracılı, indükleyici ajan bir nükleer

faktör (NF) -kb gibi hareket eden bir yüzey yapısı oluşturduğu tespit edilmiştir^{88, 89}. Ayrıca önemli ölçüde mide hücrelerin asit sekresyonunu inhibe eden, gastik H / K ATPaz ekspresyonunun azalmasına sebep olan H/K ATPaz transkripsiyonunu baskılamaktadır. *cagM* ekspresyonu gastrik aside karşı *H. pylori*' yi koruyabilir. *cagM* ekspresyonu çeşitli gastrik hastalık ile ilişkilidir. Bazı çalışmalarda *cagM*' nin gastrik kanser, peptik ülser ve gastrit ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir³³. *cagM* sadece *cagPAI* aparatının bütünlüğü açısından değil, aynı zamanda hastalığın şiddetini belirlemek ve *H. pylori*' yi mide asidine karşı savunmada oldukça önemli bir proteindir⁸⁹.

2.2.4.3 *cagL*

Helicobacter pylori cagL mutasyonu konak hücre içine *cagA*' nın girmesini sağlayan tip IV sekresyon sistemini bloke eder³³.

2.2.4.4 *CagT*

Şaperon benzeri *H. pylori CagT*, bakterinin yüzeyinde bulunur. Genellikle iç membranda lokalize olan bu proteinler, *cagPAI*' nin önemli bir komponentidir ve konak hücrelere *cagA*' nın translokasyonunda önemli bir rol oynar. Ancak *CagT* sekresyonu, hücre kültürü süpernatlarının immünopresipitasyon analizinde tespit edilmemiştir. Aynı zamanda, *cagT* konak hücrenin IL-8 sekresyonu ile ilişkilidir. *cagT* ekspresyonu çeşitli gastrik hastalıklarla ilişkidir . *cagT* geni *A.tümeفاعiens*' in *vir B7* ile homologtur ve *cagII* bölgesinin önemli markerı olabilir³³. bazı çalışmalar göre *cagT* hücrenin iç ve dış membranına yerleşiyor ve proinlamatuvar sitokinlerden IL-8' in sekresyonunu sağlar^{90, 91}. Bazende şaperon proteinler gibi *CagA* ile etkieşime girerek konak hücreye translokasyonunu kolaylatırır⁹². *H. pylori* de *CagT* ekspresyonu gastrik hastalıklarla yakın ilişkili bulunmuştur ve yapılan bir çalışmada gastrik kanser ve ülcerli hastalardan izole edilen suşlarda *cagT* geninin yüksek delesyonlar görölmüştür^{93, 94, 95}. Çalışmalarda *H. pylori*' nin yüksek virölans geni olduğu düşünölen *cagT* geninin peptik ülser gibi şiddetli gastrik hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir^{96, 97, 98}. *cagT*, *CagA* gibi diğör virölans faktörlerle (*vacAs1*, *vacAm1*, *vacAs2*, *vacAm2*, *vacA s1m1*, *vacAs2m2*) ilişkilidir⁹⁹.

2.2.4.5 *cagI*

Özel *cagPAI* protein olan *cagI*, *cagA* translokasyonu için gereklidir fakat gastrik epitel hücrelerinde IL-8 oluşumu için gerekli değildir¹⁰⁰. Biyoinformatik analizlerle iç membrana lokalize *CagI* N-terminal hidrofobik sarmal yapısı 26-51 rezidü kapsadığı ve sitosolik yüzeyinde *cag* T4SS' ne **CagA** taşınmasında önemli bir rol oynadığı tahmin edilmiştir¹⁰¹.

2.2.4.6 *CagE* ve *virB11* Geni

cagE *cagPAI*' nin sağ yarısında yer alan ve çalışmalarda bu genin sağlam bir patojenite adasının markerı olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir^{102, 103}. *virB11*, 6 monomerik birimlerden oluşan halka şeklinde bir yapıya sahip bir protein kodlamaktadır^{104,105}. Bu genler gerekli substraların taşınması için gerekli enerjiyi sağlayan ATPase aktivitesine sahip transmembrane proteinleridir. *cagE* ve *virB11* genlerinin düedonal ülser, peptik ülser ve gastrit ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte sadece birkaç çalışmada da gastrik kanserle ilişki olduğu gösterilmiştir¹⁰⁶.

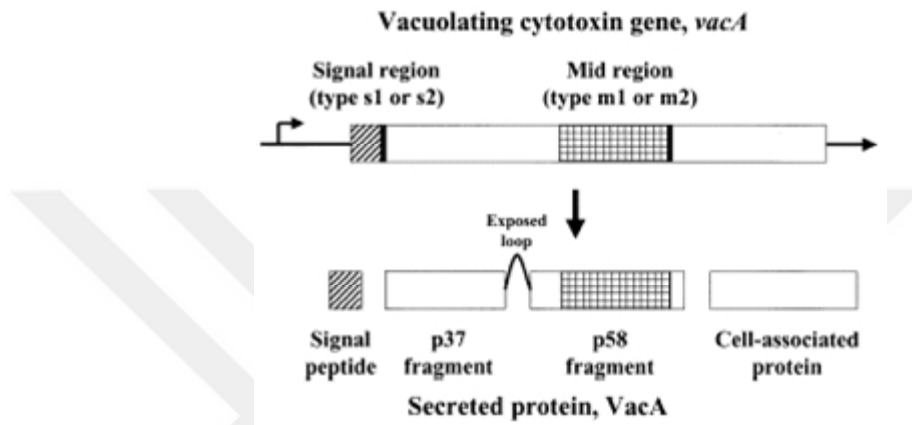
2.2.4.7 *cagG*

cagG, *cag-PAI* sağ tarafında yer alır ve *cagI* bölgesinin belirteci olduğu bildirilmiştir. Bu gen, bir vir homologu değildir, ancak flajella veya pilus biyosentez protein genleri ile zayıf bir homolojileri vardır³³. Ayrıca, proinflatuar sitokin interlökin-8 indüklenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Bazı çalışmalar *cagG*' nin gastrik epitel hücrelerine adezyonu ile ilişkili olabileceğini ileri sürmektedir. *cagG* delesyonu olan suşlarda gastrik epitele adezyonun azaldığı ve IL-8 sekresyonun azaldığı gösterilmiştir^{107,108}. *cagG* geninin sıklığı bazı gastrointestinal hastalıklarda yüksek bulunmuştur, ancak *cagG* geni ilgili spesifik bir hastalık kanıtlanmamıştır^{109, 110}.

2.2.5 Vakülizasyon Sitotoksin

H. pylori suşları *vacA* toksin geninin bir kopyasını içerir. *vacA* transkripti monosistronik ve transkripsiyon ATG başlangıç kodonundan yaklaşık 119 nükleotid yukarısında başlamaktadır^{111, 112}. *H. pylori* suşlarında nükleotid uzunlukları 3,864-3,933 arasında değişen en az 25 farklı *vacA* alleli tanımlanmıştır¹¹³. Farklı suşlardaki

vacA allelleri genetik çeşitlilik gösterebilir ve *vacA* allelleri birkaç familya içinde kategorize edilebilir. En yoğun çalışılan *VacA* formu genellikle yüksek düzeyde vakülasyon sitotoksin aktivitesi ile ilişkili **VacA** proteinlerini kodlayan tip s1/m1 *vacA* allelleri tarafından kodlanmıştır. *VacA* diğer formları daha düşük düzeyde vakuolleşme aktivitesi ile ilişkilidir.



Şekil 8. Vakuolasyon sitotoksin geninin şematik görüntüsü¹¹⁴

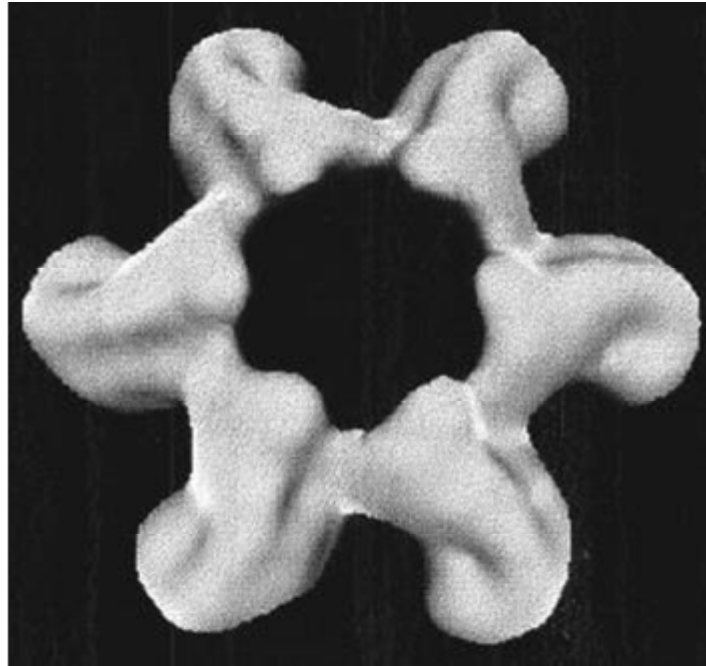
2.2.5.1 VacA Protein

VacA 140 kDa'luk protoksin olarak üretilmektedir, parçalanarak matür şekli olan 90 kDa olarak salgılanmaktadır¹¹⁴. **VacA** sekresyon işlemi esnasında protoksin, toksin aminoterminal bölgede yer alan 33 amino asitlik sinyal uçtan matür proteine dönüştürülerek hücre dışına sekrete edilir. Rekombinant **VacA**'nın farklı bölgelerine karşı oluşturulan antiserumların kullanılarak yapılan çalışmalarda, protoksinin karboksi-terminal bölümünde yaklaşık 33 kDa'lık bir polipeptid yer aldığı ve sekrete edilmediği gösterilmiştir. **VacA**'nın karboksi-terminal kısmı, β bölgesini oluşturan amfipatik β yapıları içerdiği tahmin edilmekte ve bir çok dış membran proteinlerinde bulunan fenilalanin içeren terminalleri vardır¹¹⁵.

2.2.5.2. VacA'ın oligomerik yapısı

Daha önce yapılan çalışmalarda, matür **VacA** monomer kütlesi yaklaşık 90 kDa olan, non-denatüre edici şartlar altında bütün olan veya çok büyük kompleks yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Lupetti ve ark. deep-etch elektron mikroskobu kullanılarak

saflaştırılmış **VacA** ultra yapısını incelemiş ve toksin altı veya yedi "petaller" ile 30 nm çapında bir halkadan oluştuğu, büyük çiçek şeklinde kompleks bir yapıya sahip olduğunu göstermişlerdir¹¹⁶. Bu mikroskobun üç boyutlu rekonstrüksiyonu **VacA** oligomerlerinin yüzeyinin ayrıntılı bir incelenmesini sağlamıştır. **VacA**'nın çiçek gibi kompleks yapısının yanı sıra merkezi bir halka olmadan altı ya da yedi petallerden oluşan "düz form" farklı bir tip olarak nitelendirilmiştir. Düz formu oluşturan petaller saat yönünün kiralitesi yani tersi şeklinde bir merkezden yayılırlar. Multiple yani birden fazla model, **VacA**'nın kiral düz formların ve kompleks çiçek yapısının montajını açıklamak için önerilmiştir. Bir modelde, çiçek gibi formlar yaklaşık 90 kDa büyüklüğünde altı veya yedi monomer içerdiği öne sürülmüştür. Başka bir modelde, çiçek gibi formların yaklaşık 90 kDa **VacA** monomerlerin tetradekamer ya da dodekamer olduğu, düz formların heksamer veya heptamer olduğu ileri sürülmüştür. **VacA** asidik veya alkalik pH'ya maruz kaldığında, **VacA** oligomerleri, yaklaşık 90 kDa'lık monomer bileşenleri 6-14 nm uzunluğunda parçalara ayrılmaktadır. pH aracılı parçalanma **VacA** sitotoksik aktivitesinde belirgin bir artış ile bağlantılıdır¹¹⁷. Suda çözünür **VacA** oligomerleri **VacA** monomerlerine kıyasla nispeten daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir.



Şekil 9. VacA oligomerinin electron mikroskobunda, üç boyutlu üst yüzey görüntüsü¹¹⁴

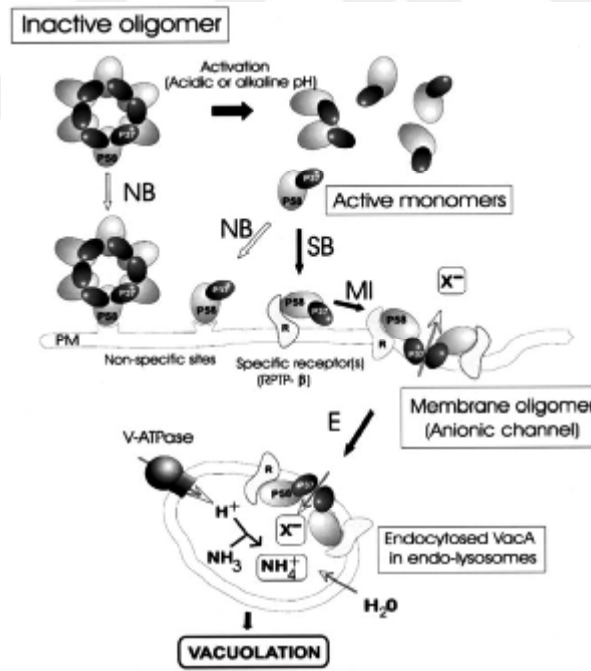
2.2.5.3 Farklı *H. pylori* suşlarında *vacA* alleller arasındaki varyasyonlar

H. pylori, diğer bakteri türlerinde olduğu gibi geniş rekombinasyonlarla sonuçlanan büyük genetik varyasyonlar sergiler^{118,119}. *H. pylori* suşlarında farklı *vacA* allelleri sekans analizi ile incelendiğinde bazı bölgelerinin özellikle 5' ucu ile sonlanan gen bölgelerinin korunduğu açıklanmıştır. Bu bölgelerdeki rekombinasyonlar filogenetik klonal yapıya zarar vermektedir. Maksimum çeşitlilik sergileyen *vacA* bölümünün ~ 800 bp orta bölgesi, 58 kDa *vacA* alanının bir kısmını kodlar. *vacA* bölgesinin 5' ucuna yakın bölgenin aksine orta bölge M1 ve M2 olarak adlandırılan filogenetik olarak iki allele ayrılır¹²⁰. *H. pylori vacA* tip m1 ve m2 allelleri Japonlar hariç tüm dünya nüfusunda yaygın bulunmaktadır ayrıca Japonlarda tip m2 alleleri tartışmalıdır ve nadiren bulunabilir. Tip m1 ve m2 allelerinin bulunduğu orta bölgede rekombinasyonlar azdır ve sadece Çin' de izole edilen *H. pylori* suşlarının bir kaçında m1/m2 rekombinant allelleri tanımlanmıştır¹²¹. Suşlardaki orta bölge rekombinasyonları sık bulunmuş fakat m1 ve m2 alleleri içinde filogenetik yapıyı kaldırmaya yeterli olmamıştır¹²¹. *vacA* orta bölgeden hariç *vacA* allelleri arasında, çeşitli küçük bölgeler belirgin farklılıklar göstermektedir. Özellikle, "sinyal bölgesi", amino terminal sinyal peptidi ve işlenmiş toksinin amino ucunu kodlayan kısmı suşlar arasında çarpıcı çeşitlilik sergiler. Sinyal bölgelerin *s1* ve *s2* olarak adlandırılan iki ana alleli tanımlanmıştır ve *s1* alleli *s1a*, *s1b* ve *s1c* subtiplerine ayrılmaktadır. *vacA* allellerinde yoğun rekombinasyonlar sonucunda orta ve sinyal bölgelerinde *s1a/m1*, *s1b/m1*, *s1c/m1*, *s1a/m2* gibi kombinasyonlar tanımlanmıştır^{121,122,123,124,125}. Nükleotid değişim oranlarının analizi *vacA* evrimine daha ilginç bakış açıları sağlamıştır. *vacA* bölgeleri arasında sinonim değişimin oranlarındaki belirgin farklılıklar yoğun rekombinasyon ve *vacA* içindeki genetik unsurların doğal seleksiyon ile bağlantılıdır. Sinonim değişimin oranlarının non-sinonim değişime oranı *VacA* fonksiyonundaki yapısal kısıtlamaların bir ölçüsüdür. Bu oran *m1* ve *m2* bölgeler arasındaki karşılaştırmalar için benzer, ancak *m1* ve *m2* bölgeler arasındaki karşılaştırmalar için daha yüksektir.

2.2.5.4 *vacA*'nın biyolojik aktivitesi

vacA'nın hücreler tarafından bağlanması ve alımı henüz net olarak anlaşılamamıştır ve bu araştırma alanında pek çok belirgin çelişkiler vardır. Flow-sitometri analizi ile değerlendirildiğinde *vacA*'nın prototipik *S1/m1* formu yoğun bir

şekilde HeLa hücrelerine bağlanır. Buna karşılık, yoğun bağlanma 12I işaretli *vacA* ile klasik ligand bağlanma deneyleriyle tespit edilmemiştir. *vacA*'nın asit muamele edilmesi belirgin olarak vakuolleşme etkinliğini arttırdığını, ancak HeLa ve BHK hücrelerine bağlanmasını artırmadığı görülmüştür. Asit aktivasyonun aksine AZ-521 sistemi toksinin gastrik hücreye bağlanmasını güçlendirmektedir¹²⁶. Çeşitli spesifik *vacA* reseptörleri tanımlanmıştır. AZ-521 sistemdeki reseptör intraselüler tirozin fosforilasyonunu regül eden 250 kDa ağırlığında, “reseptör tip protein trizin fosfataz- β (RPTP β)”dır. *vacA*'nın bağlanmasında RPTP β hayati bir rol oynar¹²⁷. İki *vacA* reseptörün varlığı gösterilmiştir, AZ-521 sisteminde 140-kDa büyüklüğünde tanımlanmamış bir protein ve HeLa ve AGS hücrelerinde epidermal growth faktör reseptörüdür. Bu reseptörlerin hem aktif hemde aktif olmayan *vacA*'da çok sayıda yüzey bağlanma bölgelerinin var olabileceği ve farklı hücrelerde belirli *vacA* reseptörlerinin varlığı tespit edilmiştir¹²⁷.



Şekil 10. Epitel hücre ile *vacA* etkileşimi gösteren model¹¹⁴

2.2.5.5. Vakuolasyon aktivitesi ve *cagA* arasındaki ilişki

Sitotoksin ilişkili gen *cagA* ve vakuolasyon aktivitesinin arasındaki ilişki gizemli bulunmuştur. Özellikle, *cagA*' ın insersiyonel mutajenezi ya da *cag* patojenik adalarındaki (PAI) delesyonlar *vacA* ekspresyonunu veya aktivitesini değiştirmemektedir. Farklı *vacA* allel tiplerinin keşfi şu şekilde açıklanabilir: *cagA* ile *vacA* s1 allel tipinin varlığı arasında yakın bir genetik ilişki vardır¹²⁸. Ancak, *H. pylori* türleri arasında yüksek düzeyde rekombinasyon ve *H. pylori* kromozom üzerindeki *cag* PAI ve *vacA*' nın ayrımı göz önüne alındığında bu genetik ilişki açıklanamamıştır¹²⁹. *cagPAI* ve *vacAs1* tiplerinin varlığı veya yokluğu, suşlardaki avantajı henüz belirlenmemiş gibi görünüyor¹³⁰.

2.2.6 *H. pylori*' ye Karşı Oluşan İmmün Cevap

H. pylori hem hücrel hem de humoral immün cevaba neden olur. Lokal ve sistemik antikor cevapları IgA, IgM ve IgG izotipleri içerdiği gösterilmiştir. Fare modellerinde yapılan ilk çalışmalarda, *H. pylori* antijenleri ile immünizasyonda koruyucu bağışıklık meydana geldiği gösterilmiştir¹³¹.

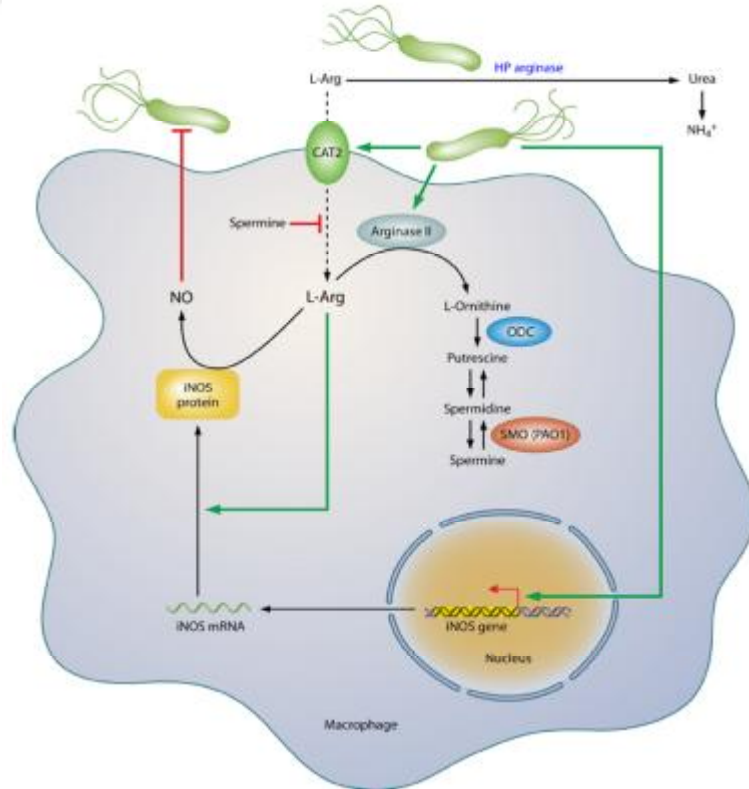
H. pylori proteinlerinin mide lamina propria içinde gösterilmesine rağmen invaziv olmayan patojen *H. pylori* genellikle ekstraselüler mukus tabakası içinde bulunduğu kabul edilmiştir. Bununla birlikte, bir çok çalışma, atrofik gastritli fare, maymun ve insalatin midelerinde hem in vivo hem de in vitro olarak *H. pylori*' nin gastrik epitel hücreleri istila yeteneğini göstermiştir. *H. pylori*' nin lamina proprianın mikrodamarlar içinde eritrositlere bağlı olduğu gösterilmiştir. Mide kanseri vakalarının çoğunda lamina propria immün hücreleri ile *H. pylori*'nin doğrudan temasını göstermek için gold immün algılama ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılmıştır¹³².

2.2.6.1 Efektör Hücreler; Makrofajlar.

Makrofajlar, mukoza yüzeyinde bakterilerle doğrudan temas halinde olan epitel hücrelerindeki, *H. pylori* kaynaklı ürünler ve sinyallerine karşı doğal cevap için gereklidir. Monositler ve makrofajlar patojenlere karşı bağışıklık yanıtlarının önemli koordinatörleridir ve *H. pylori* enfeksiyonlarında IFN- λ , IL-12 gibi sitokinlerin üretimi, Th1 hücrelerinin sitümülasyonu gibi adaptif immünitenin aktivatörleridir^{133, 134}. Nötrofil aktive edici protein (NAP), ve nötrofiller ve monositlerden salgılanan hem IL-23 hem

de IL-12 sitokinlerini sitümüle ederek Th1 polarizasyonuna katkıda bulunur. *cagA* pozitif *H. pylori* suşları ile enfeksiyonda Th1 cevabının sitümülasyonundan dolayı mide mukozasındaki IL-12 üretimi peptik ülser gelişimi ile bağlantılıdır. Makrofajlar, aynı zamanda IL-1, TNF-a, ve IL-6 gibi sitokinlerin üretimiyle inflamatuvar yanıtta yer alırlar. IL-6 aktivasyonu NF-KB sinyali, MAP kinaz ve TLR4 aktivasyonu ile bağlantılı bulunmuştur. IL-12' yi oluşturan p40 heterodimer ve p70, IL-23' ü P19 ve P40, IL-23, ve IL-12 oluşturan ortak heterodimer p40 alt ünitesine sahiptir. Özellikle son zamanlarda, *H. pylori* gastritinde IL-12 p40 ekspresyonun arttığı ve aynı zamanda epitel hücrelerinin yanı sıra makrofajlarda lokalize IL-23' ün arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, T-hücre yanıtının sitümülasyonunda IL-12 ve IL-23' ün rolünün açıklanması için ek çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Makrofajlar efektör fonksiyonları sayesinde, *H. pylori*' ye karşı güçlü bir savunma potansiyeli oluşturur. İn-vitro ve in-vivo da makrofajlar tarafından NO sentaz (İNOS veya NOS2) enzimden türetilmiş nitrik oksit üretiminin (NO) upregüle olduğu gösterilmiştir¹³⁵.

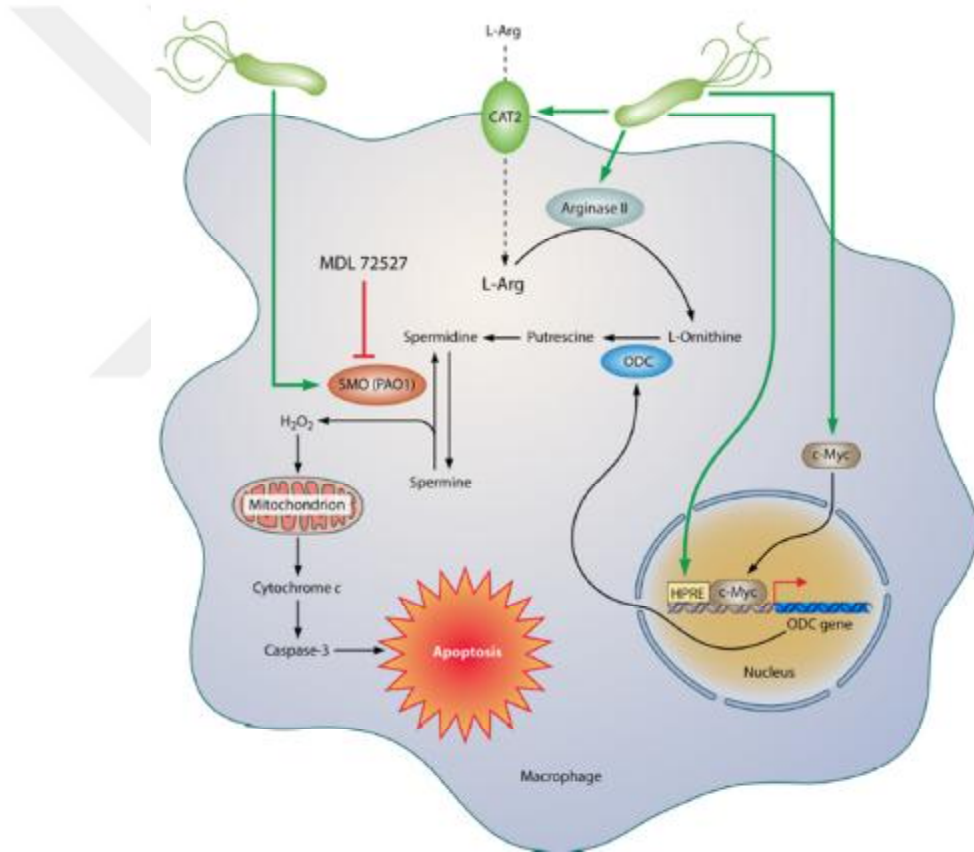


Şekil 11. *H. pylori*' ye karşı cevaben gelişen makrofaj iNOS sentezinin düzenlenmesi ve NO üretiminin regülasyonu⁶⁵

Ko- kültür çalışmaları ile *H. pylori*' inin makrofajlar tarafından elimine edildiği gösterilmiş ve bu antibakteriyal savunma NO bağımlıdır. *H. pylori*' nin *rocF* geni tarafından kodlanan arjinaz enzimi, konak hücrede L-argininden (L-Arg) NO üretimini sağlayan İNOS substratını parçalayarak bakterinin hayatta kalmasını sağlar¹³⁶. Üstelik bu yarışma iNOS protein sentezini bozarak makrofajlardaki L-Arg' ni tüketebilir. Bakteriyel arginaz L-Arg' den üre üretir ve daha sonra gastrik asidi nötralize etmek için gerekli olan bu amonyak üreaz tarafından kullanılmaktadır¹³⁷. Makrofajlarda iNOS indüksiyonu M1 tipi alternatif klasik aktivasyon yoluyla oluşurken, arginazı aktive eden L-Arg metabolizması M2 yolunda yer almaktadır. Makrofajların *H. pylori* ürünleri ile maruz kalması arginaz II enziminin artışıyla sonuçlanır. Arginaz indüksiyonu en az üç patojenik rol uygular. İlk olarak, arginaz İNOS için bulunan substratı tüketir. *H. pylori* ile uyarılmış makrofajlarda, İNOS protein translasyonu kültür ortamında L-Arg düzeyine bağlıdır ve bakterinin öldürmesi için yüksek L-Arg seviyesi gereklidir. Buna uygun olarak, *H. pylori* ile enfekte edilmiş farelere oral arginaz önleyicisi uygulamasıyla gastrik makrofajlarda iNOS protein ekspresyonu ve NO üretimi artarken, artan İNOS translasyonu ve NO üretimi arginaz veya Arg2 inhibisyonunu sağlar¹³⁷. İkincisi, Arg2 poliaminlerden L-ornitini üreterek makrofajların apoptozunu indüklemeye önemli bir role sahiptir¹³⁶. Son olarak arjinazdan ornitin üretimi, ornitin dekarboksilaz tarafından üretilen poliaminler için gerekli olan substrat seviyesini azaltır ve bu durum İNOS inhibisyonu ile sonuçlanır. Özellikle, spermin poliaminleri iNOS transkripsiyonu değiştirmek yerine, iNOS protein translasyonunu ve NO üretimini bloklar. RNA etkileşimi ile parçalanmış ornitin dekarboksilaz iNOS proteinin ekspresyonunun artışına sebep olur ve NO üretimi makrofajlar tarafından *H. pylori*' nin öldürmesine katkı sağlar¹³⁷. Spermin ile İNOS inhibisyonu da İNOS translasyonu için gerekli katyonik amino asit taşıyıcı 2 (Cat 2) tarafından makrofajlara L-Arg alımını bloke edilebilir ve Metabolik enzim SMO indüksiyonu ile sperminin tükenmesi iNOS protein sentezi ve NO üretimini kolaylaştırır. NO üretimini kısıtlayan biyokimyasal olaylar bir yandan patojenlere karşı cevapta oluşan NO' in toksik etkilerinden makrofajları korur diğer yandan bakterinin uzun süre kolonizasyonunu sağlar. Bu bulgular, mukozal makrofaj aracılığıyla sentezlenen iNOS kaynaklı NO disfonksiyonunun, neoplastik transformasyon riskini artırdığını ve bakterinin persistesinde temel bir rol oynadığını göstermektedir^{135, 136,137,138}.

2.2.6.1.1 Makrofaj aracılı apoptosis

Konağın inflamatuvar yanıtları makrofaj aktivasyonu tarafından geliştirilmiştir, ancak makrofajlar aracılığıyla oluşan apoptoz ciddi zararlı sonuçlar doğurabilir. *Shigella* enfeksiyonunda olduğu gibi ölü hücrelerden sitokin salınımı önemli olabilir ve apoptotik hücreler, hücre kalıntılarından nötrofil infiltrasyonu stimüle eder ve aktive nötrofiller tarafından salınan serbest oksiradikaller oksidatif stresi artırır¹³⁹. Ayrıca önemli olan efektör hücrelerin azalması ile konak savunmasının kaybının net etkisidir. Poliaminlerin üretimi makrofaj-apoptozuna doğrudan katılır.



Şekil 12. *H. pylori*'nin neden olduğu makrofaj apoptoz mekanizması⁶⁵

2.3. Mide kanseri

Gastrik kanseri olarak da bilinen mide kanseri, mide duvarında gelişen kanser türüdür. Mide kanseri dünyada hem erkeklerde hem de kadınlarda akciğer kanserinden sonra, kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedendir¹⁴⁰. Mide kanserinin

en yaygın nedeni, vakaların %60' ının *Helicobacter pylori*' ye ait enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir. *H. pylori* türlerinin diğerlerine göre mide kanseri riski daha fazladır. Diğer yaygın nedenleri salamura sebze ve sigaradır. Vakaların %10' u ailesel ve % 1-3 arasında vakalar, kalıtsal diffüz mide kanseri gibi kişinin ebeveynlerinden miras kalan genetik sendromlardan kaynaklanmaktadır¹⁴¹. Mide kanserlerinin çoğu gastrik kanserlerdir. Bu türler alt bölümlere ayrılabilir. Lenfomalar ve mezenkimal tümörler de mide içinde gelişebilir. Çoğu zaman mide kanseri birkaç yıl içinde farklı evrelerde gelişir. Tanı genellikle endoskopi sırasında yapılan biyopsi ile konur. Daha sonra hastalığın vücudun diğer bölgelerine yayılmış olup olmadığını belirlemek için tıbbi görüntüleme ile takip edilir.

2.3.1 Mide kanseri risk faktörleri

Çeşitli parametreler malignite gelişimine yol açabilen, karmaşık etkileşimler kurarak mide kanseri için risk faktörü olarak öne sürülmüştür. Çevre faktörleri ve yaşam tarsi mide kanseri için risk önemli roller oynayabilir. En çok bilinen mide kanseri risk faktörleri arasında diyet ve beslenme şekilleri, genetik yatkınlık ve düzensiz olarak meydana gelen mutasyonlar ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonudur. Son zamanlarda ise, bakteriyel enfeksiyonlara karşı oluşan inflamatuvar yanıtın da malignite riski açısından önemli etken olduğu ortaya çıkmıştır.

2.3.1.1 Beslenme ve Diyet

Gastrik kanser etiyolojisinde diyet, vitamin ve bazı öğelerin artışı, karsinojen oluşumunu azaltma ve karsinojenik moleküllerin veya prekürsörlerinin kaynağı olarak çift rol oynar.

Konserve etlerdeki yüksek tuz mide kanseri etiyolojisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Tuz mide epitelini tahriş edebilir ve buna bağlı olarak *H. pylori* enfeksiyonu mukozal tabakanın hasarına yol açabilir. Böylece hassaslaşan mide epitel hücreleri kanserojen molekülleri biriktirir. Pastırma, sosis, salam ve jambon gibi et ürünlerindeki yüksek tuz oranı, sigara, nitrit ve nitrozaminler mide kanseri ile ilişkili olabilir^{142,143}.

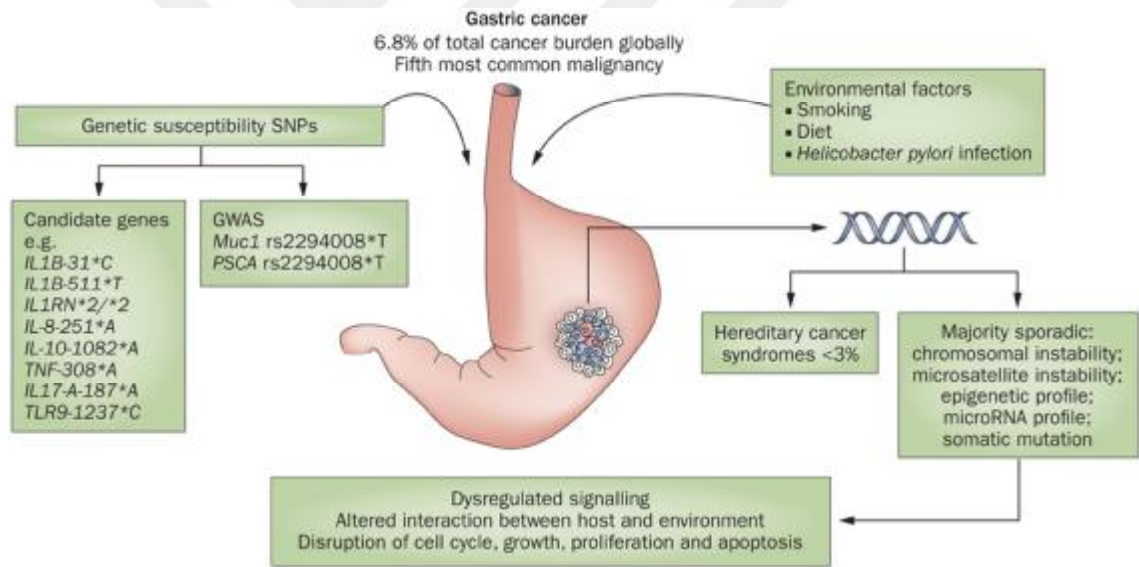
Sebze ve meyve ağırlıklı beslenme gastrik kansere karşı koruyucu etki gösterirken tuzlu yiyeceklerin tüketilmesi malignite riskini artırmaktadır. Genellikle

selenium, C vitamini ve likopen gibi antioksidan moleküller, gastrik kanseri riskini azaltıyor^{144,145,146}. Buna karşılık, β -karoten, A ve E vitamini ve gastrik kanseri arasındaki ilişki halen tartışmalıdır^{144, 145}.

Kırmızı ve işlenmiş etlerin yüksek tüketimi, tuzlu gıdalar ve fazla tuz alımı gastrik kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir^{144, 145}.

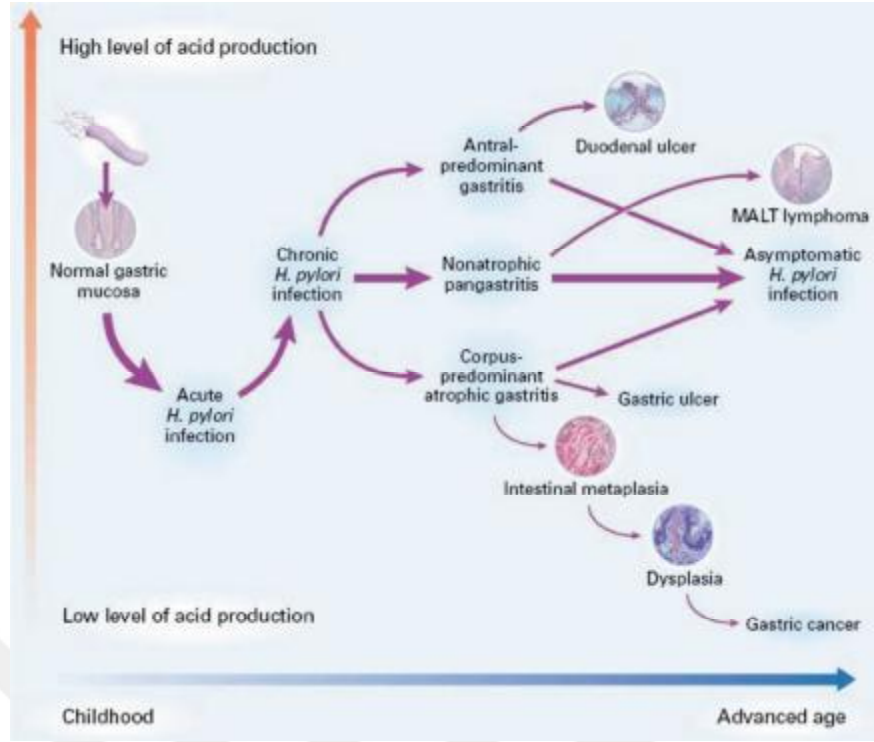
2.3.2 Mide kanserinin patogenezi

Gen-çevre etkileşiminin klasik bir örneği olan mide kanserinin patogenezi multi faktöriyel ve karmaşık bir süreçtir. Mide karsinogenezisi altında yatan kesin mekanizmalar histolojik malin tipine göre değişir ve henüz tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 13. Mide kanserinin patogenezi

Mide kanserinin etiyolojisinde üç major faktör rol oynar: 1) Çevresel faktörler, beslenme ve yaşam tarzı, 2) *H. pylori* enfeksiyonu 3) Konağa bağlı genetik faktörler.



Şekil 14. *H. pylori* enfeksiyonunun gastrik klinikopatolojik sonuçları.

Bir çok ciddi ve sürekli inflamatuvar cevap kronik atrofik gastrit neden olur. Kronik atrofik gastrit diffüz ve intestinal tip kanserin oluşumuna zemin hazırlayan, gastrik mukoz hücrelerinin ve bezlerinin kaybı ile karakterizedir. Kronik atrofik gastrit en sık mide (antrum) alt kısmında başlar ,daha sonra mide (korpus) gövdesine doğru yani yukarı kısma kadar uzanır ve mide asiti salgısında azalmaya (hipoklorhidri) neden olurlar. Daha az asidik mide, *H. pylori*' nin gelişmesi için daha uygun olmakla birlikte, aynı zamanda diğer mikroorganizmaların da kolonizasyonunu sağlar. Bu sebeple bakteri kolonizasyonu ve inflamasyon, gastrik epitel hücrelerinde hücresel ve genomik değişikliklerin ihtimalini artırarak, mide de kanserojen moleküllerin birikmesine yol açabilirler. Müsin dolu goblet hücrelerinin görünümü de dahil olmak üzere, bir dizi histolojik, fizyolojik ve moleküler değişiklikler transformasyonu esnasında ortaya çıkar. Bu değişiklikler *H. pylori* tarafından iyi tolere edilmeyen ve sıklıkla transorme epitelin spontan kaybolmasına neden olur. Ayrıca daha fazla ilerleyerek nükleer atipi, düzensiz şekil ve epitelyal hücrelerin polarite kaybı dahil olmak üzere epitelde histolojik

değişikliklerle karakterize displaziye yol açar. Displazinin ileri aşamalarında bu atipik hücreler bazal membran boyunca göç ederek erken invaziv karsinoma neden olurlar.

2.3.2.1 Genetik yatkınlık ve düzensiz meydana gelen mutasyonlar

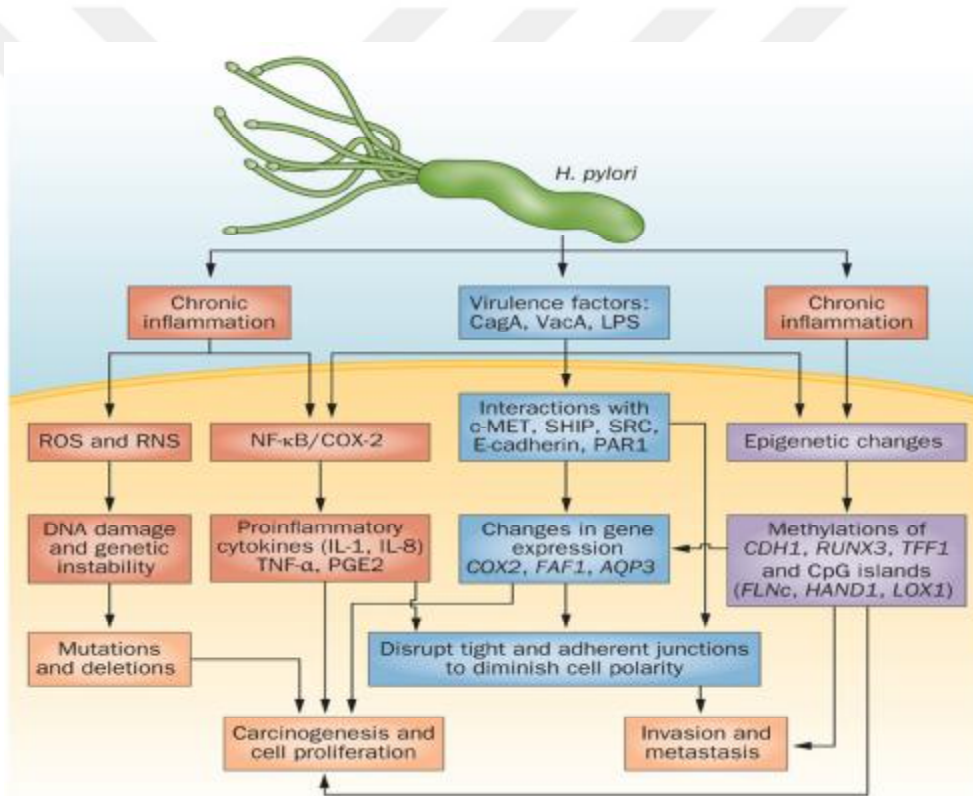
Genetik faktörler mide kanserinin gelişmesi ve ilerlemesi için temel bir rol oynar. Mikoorganizma kaynaklı mutasyonlar ve genetik sendromlar malignite gelişimine eğilim gösterdiği iyi bilinmektedir¹⁴⁷. Ailesel gastrik kanserinin aynı aileden iki veya daha fazla kişinin etkilendiği, olguların yaklaşık %10' unda görülmektedir. Genellikle gastrik kanseri hastaların akrabalarında gastrik neoplazi gelişimi akraba olmayan kişilere göre 2-3 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte aile üyelerinde genetik öykü, çevresel ve kültürel farklılıklarda (örneğin *H. pylori*, diyet, yaşam tarzı) analiz edilmedi¹⁴⁷. Ancak malignite gelişmesinde genetik yatkınlık açıkça belirlenmiştir.



Şekil 15. Mide kanseri gelişiminde farklı faktörlerin etkisini gösteren şema.

2.3.2.2 *H. pylori* enfeksiyonu

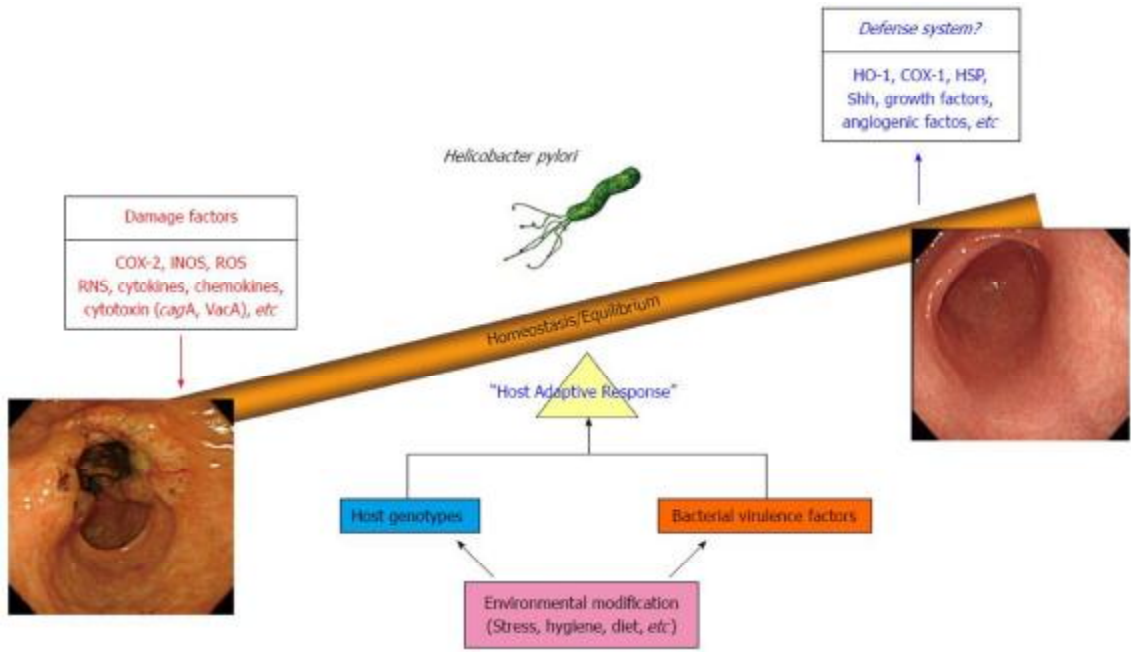
H. pylori enfeksiyonu gastik kanserin intestinal ve diffüz subtipleriyle ilişkilidir. Epiteldeki veya yakınındaki mikrobiyal durum kan dolaşımından inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu için bir uyarıcıdır. Sitokinler, kemokinler ve serbest radikaller inflamatuvar cevabı başlatır^{148,149}. İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, solunum patlamasına yol açarak serbest radikaller açığa çıkar ve bu serbest radikaller lipid peroksidasyonu ve genetik mutasyonların indükleyerek malinite transformasyonuna katkı sağlarlar. Epiteldeki bu tip hasarlar daha fazla mutasyon ve epitel hiperproliferasiyonuna, hücre ölümüne yol açarlar^{150,151,152}.



Şekil 16. *H. pylori* ve bazı virülans faktörleri⁶⁵

Dünya Sağlık Örgütü, 1994 yılında, *H. pylori*' yi gastrik adenokarsinomu gelişiminde rol oynayan, tip I karsinojen etkeni olarak tanıdı³³. *H. pylori* ve mide kanseri arasındaki ilişki iki olası mekanizma ile açıklanabilir: Bu mekanizmalardan biri *H. pylori*' nin karsinogenezi teşvik etmesi, diğeri ise uzun süreli *H. pylori*

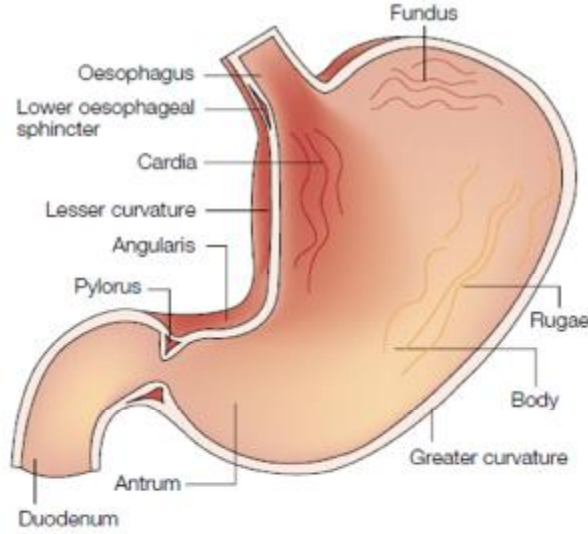
enfeksiyonun kanserojen ortamını sağlamasına dayanmaktadır. İkinci durumda *H. pylori* enfeksiyonu, intestinal metaplazi ile sonuçlanan gastrik mukozanın iltihabına ve mukozal atrofiye yol açan kronik enfeksiyona sebep olur. Bu durum gastrik kanserin öncüleri olarak kabul edilir. Gastrik kanser çok adımlı ve multifaktöriyel bir hastalıktır, ancak *H. pylori* ile enfekte tüm hastalarda gastrik kanser gelişmez. Kan grubu, çevresel faktörler, sigara ve bakteriyel virülans faktörleri *H. pylori* enfeksiyonlarını tetikler.



Şekil 17. *H. pylori* enfeksiyonu ve mide kanseri gelişiminde sorumlu tutulan konak genotipi, çevresel riskleri ve bakteriyel virülans faktörü

2.3.3 Mide kanserinin Altıpleri

Gastrik kanser tanısında mide fırçalama / yıkama gibi sitolojik veya dokuların histopatolojik değerlendirilmesi gerekmektedir. Çeşitli sınıflandırma sistemleri, mikroskopik ya da makroskopik özellikler gastrik kanserin açıklanmasına yardım etmek için önerilmiştir. Gastrik neoplazilerinin % 95'inden fazlası adenokarsinom' dur. *H. pylori* enfeksiyonu gastrik mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomaya neden olur ve *H. pylori* eradikasyonu MALT lenfomayı baskılayabilir¹⁵³.



Şekil 18. Mide anatomisi

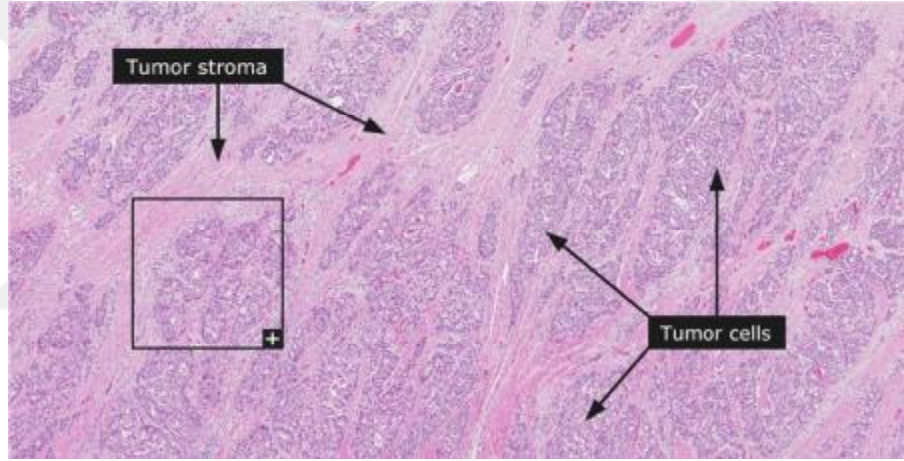
2.3.3.1 Kardia, Non-Kardia ve Korpus

Gastrik adenokarsinom midenin anatomik yapısına göre kardial ve non-kardial olarak ayrılabilir. Kardial kanser özofagogastrik kavşağın 1 cm proksimal ve 2 cm distalinde yer alan bir adenokarsinom lezyon olarak tanımlanmıştır^{154,155}. Doğu Asya’da kardial kanser artışı görülmemiştir. Dünya çapında mide kanserinin insidansı non-kardial kanseri düşüşü nedeniyle azalma olmuştur^{156,157}. Non-kardial kanser insidansı 1977-2006 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri’nde 25-39 yaş arası beyaz ırklar hariç, tüm etnik ve yaş grupları arasında azaldığı görülmüştür¹⁵⁸. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda non-kardial kanserleri arasında korpus kanserinin epidemiyolojik olarak ayrı olduğu öne sürülmüştür¹⁵⁹. Amerika Birleşik Devletleri’nde, 1976 ve 2007 yılları arasında, korpus kanser insidansının beyaz ırklarda yılda % 1 ve siyah ırklarda % 3,5 oranında artmış ve diğer etnik grupları arasında azalmıştır. Yeni veritabanında, korpus kanseri belirgin bir şekilde daha genç ve orta yaşlı beyazlar arasında 1999 ve 2007 yılları arasında artmıştır.

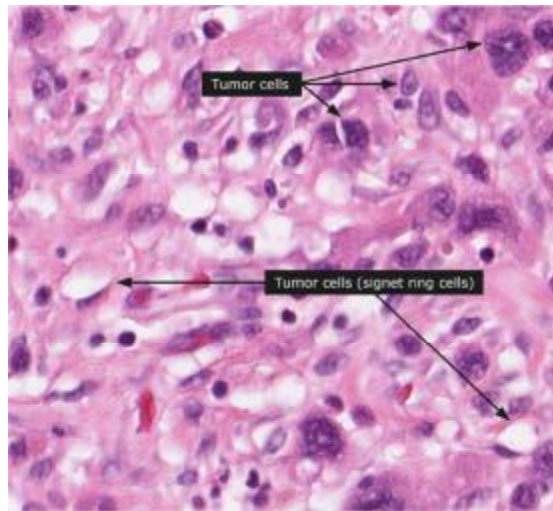
2.3.3.2 İntestinal ve Diffüz Tip Mide Kanseri

Dr Laurén 1965 yılında, gastrik adenokarsinomu, intestinal ve diffüz tip olmak üzere iki histolojik tiye ayırmıştır¹⁶⁰. İntestinal tip gastrik kanseri çoğunlukla yaşlı, diffüz tip ise genç yaş gruplarında teşhis edilir. İntestinal tip gastrik kanseri yaklaşık 30

ila 50 yıl gibi uzun bir kuluçka süresine sahiptir. 1975 yılında Correa modelinde önerildiği gibi; genellikle atrofik gastrit, kronik gastrit, intestinal metaplazi, displazi ve adenokarsinom şeklinde gelişir¹⁶¹. İntestinal tip diffüz tipten daha sıktır, aynı zamanda her ikisinin özelliklerini gösteren bazı tümörler de bulunmaktadır. Son onyıda azalan gastrik kanseri insidansı, yüksek riskli ve düşük riskli bölgelerdeki düşük intestinal tip insidansında da etkili olmuştur¹⁶². İsveç'te yapılan toplum tabanlı ve kapsamlı çalışmada; kardial kanserleri arasında, intestinal tip insidansı aynı yaş grubunda 1989-1990, 1991-1992, 1993-1994 yıllarında 100.000 kişide sırasıyla 5.1, 6.8, 7.9 olarak gösterilmiştir¹⁵⁷. Diffüz tip ise yılda 100,000 kişide sırasıyla 3.2, 4.5, 4.5 ve olarak görülmüştür.



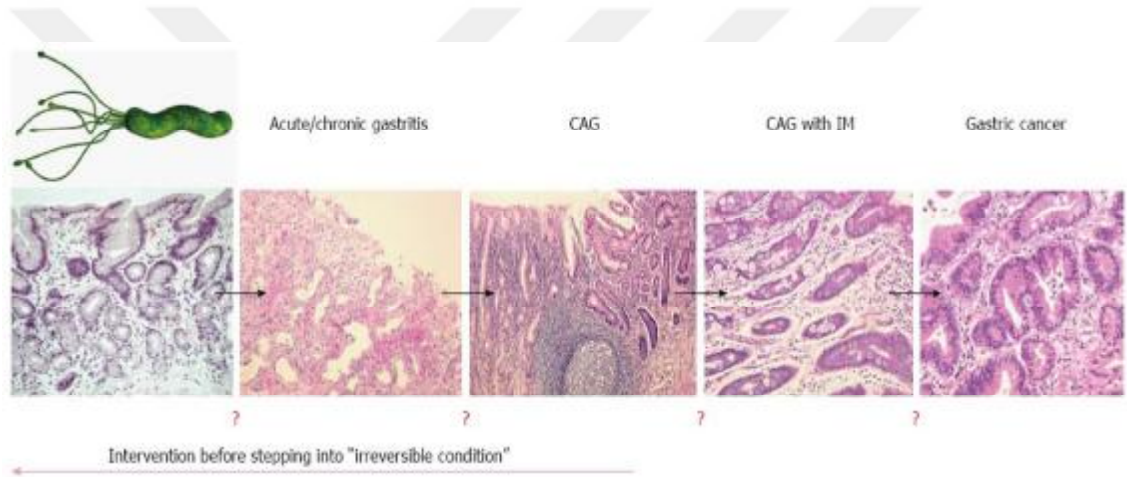
Şekil 19. Orta derecede farklılaşmış adenokarsinom, intestinal tip



Şekil 20. Az farklılaşmış adenokarsinom; diffüz tip

2.3.3 *Helikobakter pylori* ve kanser ilişkisi

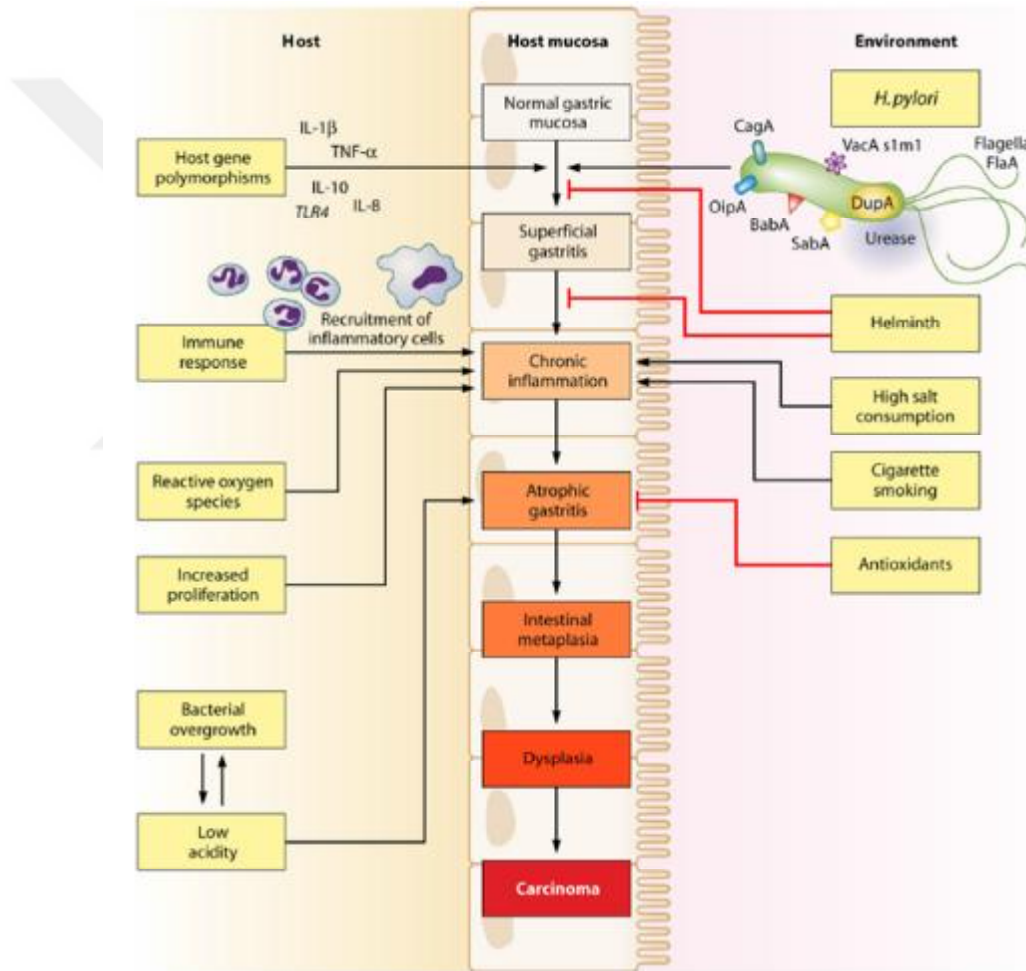
H. pylori ve gastrik kanseri arasındaki ilişki birkaç yıl için tartışma konusu olmuştur. Bu ilişki iki mekanizma ile açıklanabilir: Bu mekanizmalardan biri *H. pylori*'nin karsinogenezisi teşvik etkisine dayanmaktadır, diğeri ise longterm *H. pylori* enfeksiyonunun kanserojen ortamına zemin hazırlanmasına dayanmaktadır. İkinci durumda *H. pylori*'nin karsinogenezis arttırıcı etkiye sahip olmasa da, enfeksiyon, gastrik mukozasının iltihabına neden olur ve kronik enfeksiyon intestinal metaplazi ile sonuçlanan mukoza atrofiye neden olur. Bu son değişiklikler mide kanseri öncüleri olarak kabul edilir.



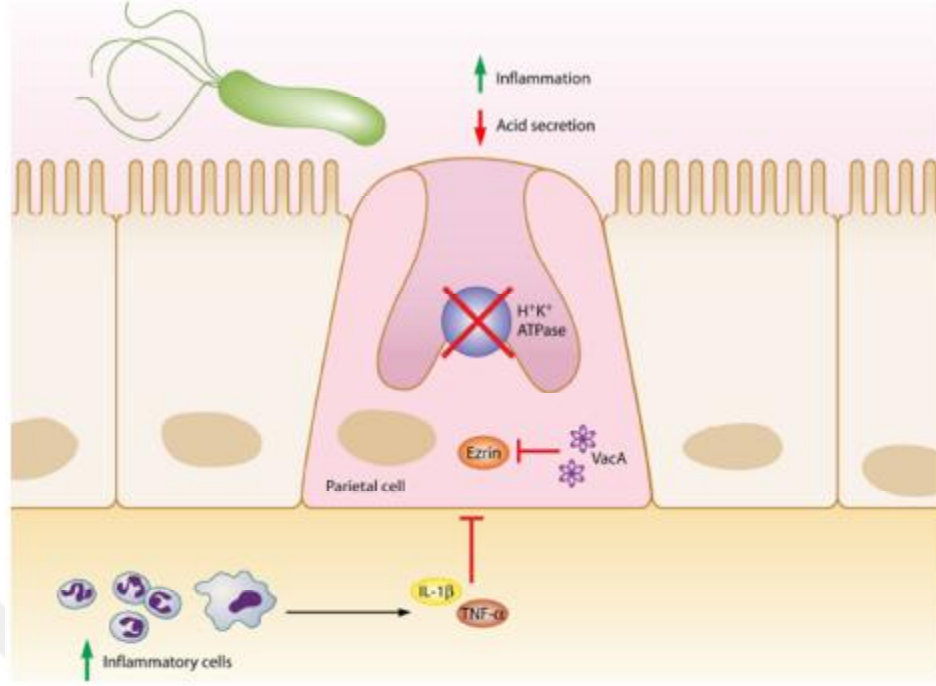
Şekil 21. Akut/kronik gastrit, kronik atrofik gastrit ve intestinal metaplaziden sorumlu olan *H. pylori* enfeksiyonu

Gastrik mukoza *H. pylori* enfeksiyonu, nötrofil infiltrasyonuna sebep olur ve aktif inflamatuvar hücreler oksijen radikalini oluşturmaktadır. Davis ve ark. *H. pylori* enfeksiyonu sonrasında gastrik pilorik ve duodenal mukozasında oksijen radikali üretiminin arttığını bildirmiştir¹⁶³. Oksijen radikaller doğrudan indükleyici maddeler olarak DNA hasarına neden olmaktadır ancak gastrik kanser ve oksijen radikalleri arasındaki ilişki yeterince araştırılmamıştır¹⁶⁴. *H. pylori* enfeksiyon nedeniyle gastrik mukozada Amonyak / Amonyum konsantrasyonu artar. Tsujii ve arkadaşları N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ile indüklenen gastrik kanserin fare modelinde amonyak içerdiğini bulmuşlardır. Askorbik asit, nitroz asitten oluşan nitroz bileşikleri

ile reaksiyona girerek nitrik oksit ürettiği bilinmektedir ve böylece N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu önler¹⁶⁵. Askorbik asitin gastrik sıvısı konsantrasyonu *H. pylori* pozitif hastalarda azalmıştır ve bu da gastrik sıvıda askorbik asit sekresyonunun artışı *H. pylori* eradikasyonunu geliştirdiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi, *H. pylori* enfeksiyonu ile ilgili pek çok soru çözüm beklemektedir. Ancak, gastrik kanser ile *H. pylori* arasındaki ilişkiyi açıklayan hem gastrik sıvı ve hem de gastrik mukozasında kimyasal değişiklikler birçok mekanizmalarla aydınlatılmıştır.



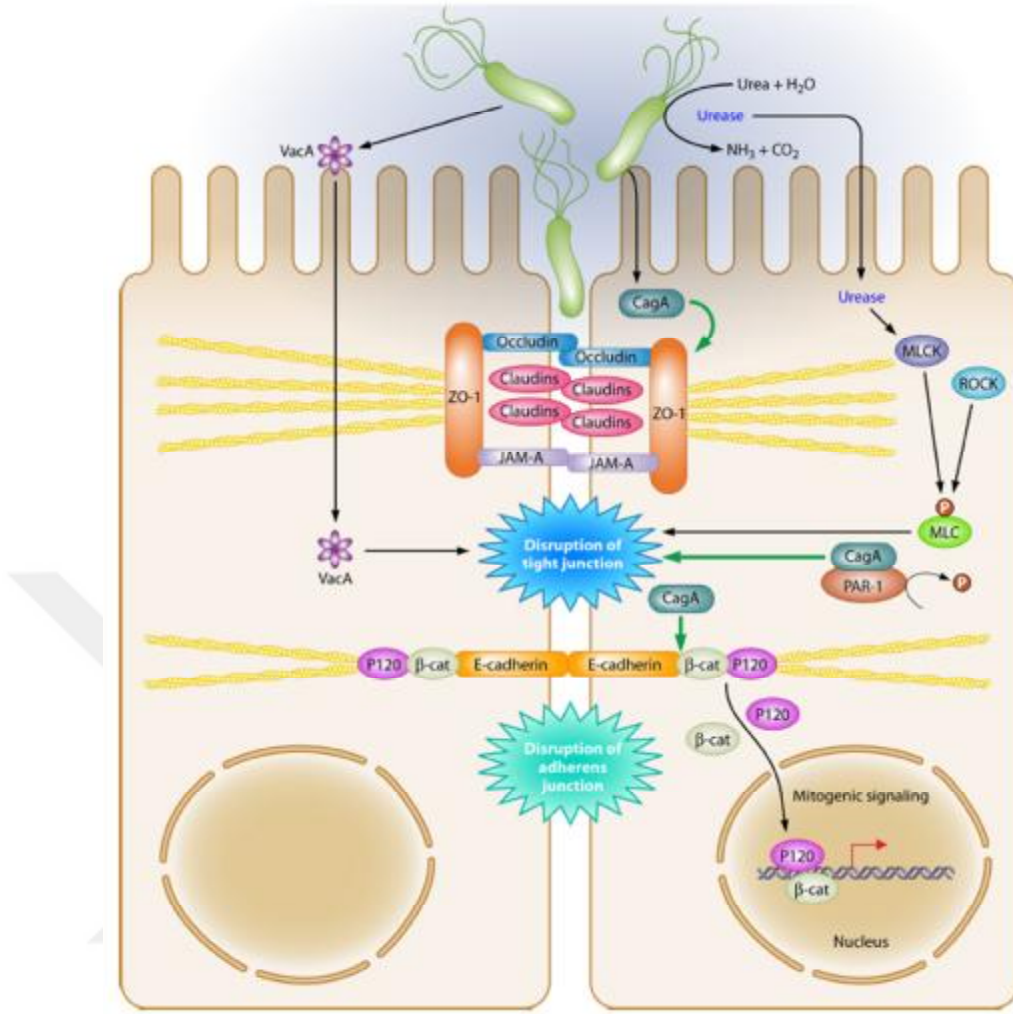
Şekil 22. Mide kanserine giden Multifaktöriyel yollar⁶⁵



Şekil 23. *H. pylori*, inflamasyon ve asit sekresyonu arasındaki ilişkiler⁶⁵.

2.3.3.1 Apikal -Junctional Kompleks

Gastrik mukozal bariyer fonksiyonu, gastrik lümende bulunan potansiyel olarak zararlı unsurların gastrik mukozaya erişmesini önlemek için gereklidir. Bariyer fonksiyonu *H. pylori* kaynaklı gastrite ve bağırsak epiteli hücrelerinde *H. pylori* ile enfekte edilmesine taviz vermektedir^{166,167}. Apikal-Junctional Kompleks bariyer fonksiyonunu kontrol eder, birçok hücrenin apikal bölgelerinde bulunur, adherens junctionların aşağısında yer alır ve tight junctionlardan oluşur.



Şekil 24. *H. pylori* Apikal -Junctional Kompleks düzenin bozulması⁶⁵

2.3.3.2 Gastrik Karsinogenesis İlişkili *H. Pylori*' nin İnflamasyon İlişkili Mekanizmaları

Gastrik mukozada *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, T ve B lenfositleri, makrofajların yanı sıra polimorfonükleer lökositlerin mukoza infiltrasyonu, konak hücrenin inflamatuvar tepkisini indükler. Enfeksiyon esnasında indüklenen sitokinler inflamatuvar hücrelerinin iyileştirilmesi ve aktivasyonunu teşvik edebilir. İnflamatuvar hücreler reaktif oksijen türlerini içeren kimyasal mediyatörler üretir. İntermediat reaktif oksijenler inflamatuvar yanıtı stimüle ederek interlökin-8 (IL-8) up-regüle olabilir. İntermediat reaktif oksijenler gastrik epitel hücrelerinin artmış oksidatif stres durumundan kısmen sorumludur ve *H. pylori* enfeksiyon esnasında gastrik sıvıda

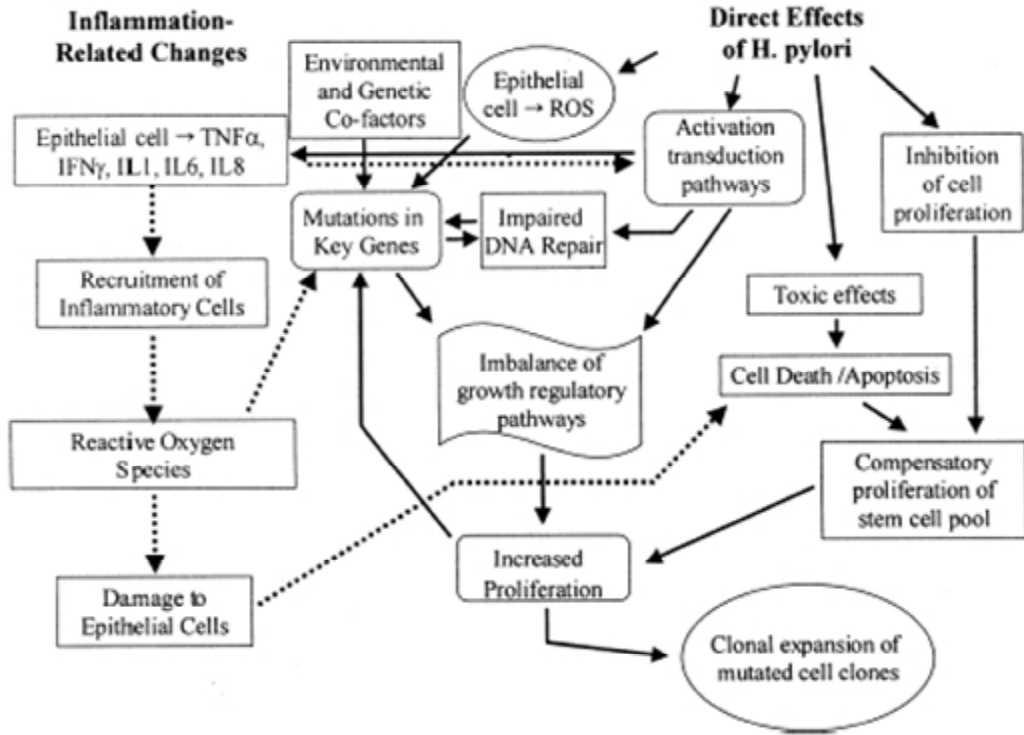
vitamin C' nin daha düşük konsantrasyonlarda bulunması gibi *H. pylori* enfeksiyonu ile ilgili antioksidan seviyelerinin artışı sağlayabilir¹⁶⁸. ROS gastrik kanser patogeneğinde katkıda bulunan DNA mutasyonlarının birikimi ile DNA hasarını neden olabilir¹⁶⁹. Buna ek olarak, epitel hücre döngüsü, *H. pylori* inflamatuvar yanıtı etkilenir. Bu kavram, *H. pylori* enfeksiyonuna yanıt olarak hem epitel hücre proliferasyonu hem de programlı hücre ölümü (apoptoz) çalışmalar tarafından da desteklenmektedir. Apoptoz, tümör nekroz faktörü (TNF) ve interferon-gama (IFN- γ), çeşitli inflamatuvar mediatörlerin yanı sıra *H. pylori* tarafından tetiklenen hücre ölümünün düzenlenmiş bir işlemidir. Periferik mononükleer kan hücreleri *H. pylori* maruz kalır inflamatuvar sitokinler için rol oynayan Fas regülasyonu, RGM-1 gastrik epitel hücrelerinde Fas antijenin ekspresyonunu indükler. Fas ligand maruz kaldığında, RGM-1 hücreleri artan proliferasyonla ilişkili hızlı ve masif hücre ölümüne yol açan PBMC-conditioned medium ile aktive edilir¹⁷⁰. Bütün bu değişimler gastrik kanseri gelişimine ve epitel hücrelerinde mutasyon olaylarına katkıda bulunabilir¹⁷¹.

2.3.3.2.1 *H. pylori* enfeksiyonu Gastrik Mukozal antijenlere karşı indüklenen antikorlar

H. pylori ile enfekte hastaların büyük bir kısmında (%50-60) gastrik mukozal antijenler ile reaktif olan serum oto-antikorlar vardır. *H. pylori* ile enfekte olmuş bir serum gastrik dokuya karşı reaksiyona giren antikorlar immünohistokimya ile incelendiğinde, antikorların iki farklı bağlanma yerleri tespit edilebilir; İlki, antrum ve korpus mukozasında foveolar epitel hücrelerinin luminal membranlarda, İkincisi ise, mide korpus mukozasında paryetal hücrelerinin kanaliküler membranların (Şek. 12) üzerindedir. Apikal salgılayıcı kanalcığında bulunan korpus parietal hücreler mide H⁺, K⁺ATPase proton pompası aracılığıyla, mide asidini salgırlar. Son zamanlarda, korpus atrofi *H. pylori* kronik gastritinde gastrik H⁺, K⁺ ATPaz major otoantijen olarak tanımlanmıştır. Hayvanlarda *H. pylori* enfeksiyonunda mide proton pompa üzerindeki Lewis antijenler yoluyla antikorları taklit ederken, insanlarda bu durum böyle değil. İnsan serumu Lewis antijenlerini eksprese etmez rekombinant H⁺, K⁺ - ATPaz ile reaksiyona girer¹⁷².

2.3.4 *H. pylori* ve Mide Kanserinin Moleküler Patogenezi

Hayvan modellerinde yapılan son çalışmalar, *H. pylori* insan izolatları ile enfekte Moğol gerbilllerinde mide kanserinin geliştiğini göstermiştir ve *H. pylori* ve mide kanseri arasındaki ilişkide, *H. pylori* etiyolojik rolü kesin olarak kanıtlanmıştır. Histopatolojik gastrik değişiklikler kronik *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkilidir ve genellikle kronik gastritten sonra atrofik gastrik ve intestinal metaplazi gelişir. Mide kanseri vakalarının çoğu genellikle ekstensive intestinal metaplazi ve multifokal atrofik gastrit ile mide mukozasında gelişir , intestinal metaplazi ve gastrik atrofi midenin premalign lezyonları olduğu öne sürülmektedir¹⁷³. Bu lezyonlar kronik *H. pylori* enfeksiyonu ile yakın ilişkilidir ve gastrik kanser ile *H. pylori* arasında bir bağlantı sağlar.



Şekil 25. *H. pylori* ve gastrik karsinogenezi bağlayan moleküler yollar.

H. pylori mekanik olarak iki şekilde gastrik adenokarsinomaya neden olabilir: (i) Gastrik epitel hücrelerinde mutasyonel olayların neden olduğu ürünlerin inflamatuvar

kolleteral hasar. (ii) *H. pylori* veya bakterilerden farklı düzeylerde salınan serbest bakteri ürünlerinin gastrik epitel hücrelerinde doğrudan etkileri:

- o Epitel hücrelerine direkt toksik etkileri
- o Apoptoz-proliferasyon dengesinin değişimi
- o Gen ekspresyonu ve transdüksiyon yollarındaki etkileri
- o *H. pylori* kaynaklı hücresel oksidatif stres
- o DNA mismatch tamir mekanizmalarının bozulması
- o Hücre adhezyonunda değişiklikler

2.3.5 *H. pylori* Tanı

H. pylori enfeksiyonunu tespit etmek için geliştirilen yöntemler arasında özellikle epidemiyolojik çalışmalarda altın standart olarak kullanılan bazı yöntemler tartışmalıdır. Bu sebeple *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı için altın standart olarak kullanılan testlerin avantaj ve dezavantajları birlikte göz önünde bulundurulmalıdır¹⁷⁴. Direkt tanı testlerinin (histopatoloji/immünohistokimya, hızlı üreaz testi, kültür gibi) bazı hassasiyetlerinden dolayı, indirekt tanı testleri antikor bazlı testler (seroloji ve idrar testi), üre nefes testi ve gaita antijen testi, *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için geliştirilmiştir. İndirekt tanı testleri arasında, üre nefes testi ve gaita antijen testi aktif enfeksiyonu belirlemek için en iyi yöntem haline gelmiştir. Özellikle serolojide yaygın olarak kullanılan antikor bazlı testler nispeten duyarlı olsa da, seçiciliği düşüktür. Mide biyopsi örneklerinin kullanarak *H. pylori* enfeksiyonunu tespitinde histoloji ve kültür gibi yöntemlerde kullanılmaktadır.

Histolojik inceleme *H. pylori* için en yararlı tanı testlerinin biridir. Histolojik inceleme yüksek duyarlılığa sahip olsa bile, biyopsi örneğinin alınan bölge, sayısı ve büyüklüğü tanısal doğruluğu etkileyebilir. Mideden alınan tek biyopsi örneği ile, tedavi edilmemiş *H. pylori* pozitif olguların vakaların% 90'ından fazlasında *H. pylori* tespit edebilir¹⁷⁵. Tanısal doğruluk için korpustan ve kurvatura yakın bölümlerden birden fazla biyopsi ile artırılabilir. Histolojik incelemeler *H. pylori* tespiti için mükemmel bir yöntemdir ve gastrik mukozası hakkında ek bilgi sağlar.

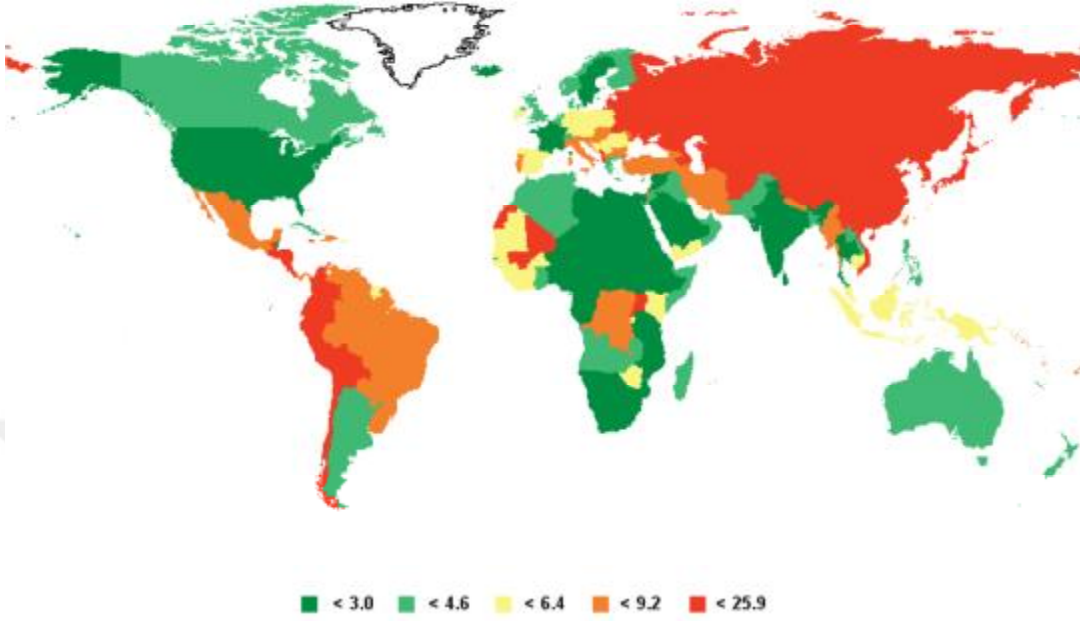
H. pylori kolonizasyonu, gastrik kanser ile ilişkisi, prevalans çalışmalarında fresh dokular (taze biyopsi numuneleri), dondurulmuş doku örnekleri ve formalinle

fikse edilmiş parafine gömülmüş dokular gibi farklı doku matreyallerinden faydalınılmaktadır¹⁷⁶. Formalin ile fikse edilmiş bloklar, parafine gömülü dokular klinik çalışmalar için avantaj sağlayan olağanüstü kaynaklar olarak tanımlanmışlardır. Bu dokuların kullanımı kolay, ucuz ve uzun süreli depolama gibi sahip özelliklerinden dolayı fresh veya dondurulmuş doku örneklerine kıyasla birçok avantajı vardır. Ancak, formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş dokulardan DNA izolasyonu zahmetli, zaman alıcı ve hala sorunlu bir yöntem olmaya devam etmektedir¹⁷⁷. Formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş dokudan izole edilen DNA' nın kullanılarak yapılan PCR etkinliğinin, kullanılan fiksatif tipi, fiksasyon süresi, DNA izolasyon prosedürleri, PCR hedef uzunluğu, DNA konsantrasyonu ve de PCR protokolü dahil olmak üzere faktörlerden etkilendiği tarif edilmiştir¹⁷⁷.

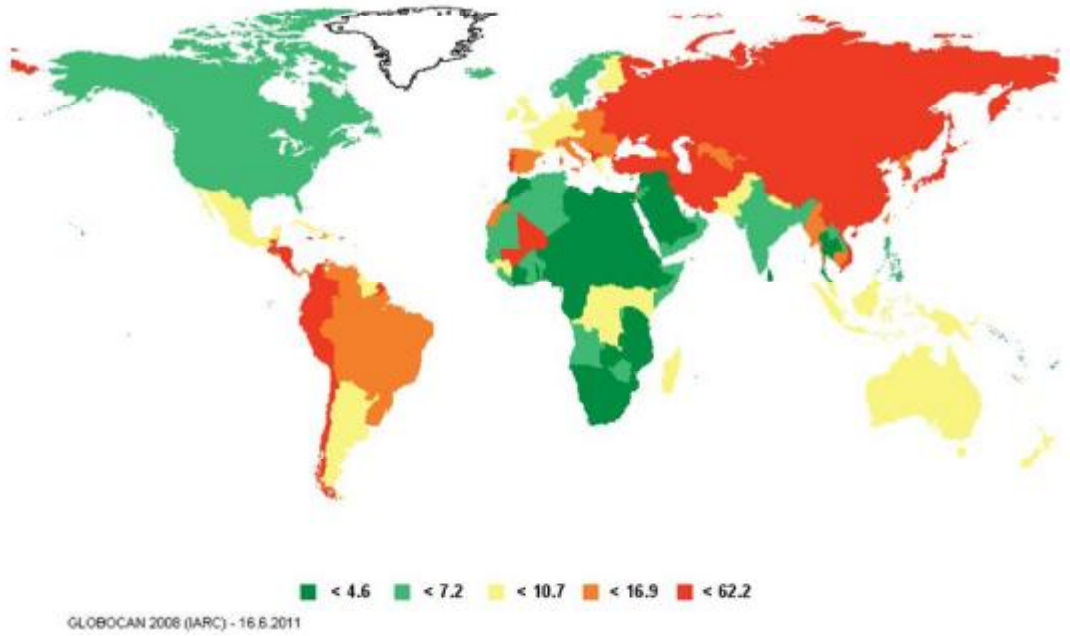
2.3.6 *H. pylori* Enfeksiyonu ve Mide Kanserinin Epidemiyolojisi

Dünya nüfusunun yaklaşık % 50' si, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, *Helicobacter pylori* ile enfekte olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında, yüz milyonlarca insanın yaşamları boyunca peptik ülser geliştirdiği ve hala on milyonlarca mide kanseri gelişmiş olabilir¹⁷⁸. *H. pylori* prevalansı son yıllarda azalmıştır, ancak farklı ülkelerde, yaş grupları ve sosyoekonomik sınıflarda büyük ölçüde değişir. Sanayileşmiş ülkelerde % 20-50, gelişmekte olan ülkelerde orta yaşlı yetişkinler arasında % 80' in üzerinde değişmektedir¹⁷⁹. Doğu Asya'da, Hindistan ve Bangladeş' te sero-prevalansı yaklaşık % 80-90, Çin ve Kore'de %60, Japonya'da %40 olarak değişmektedir¹⁸⁰. Enfeksiyon kirlenmiş su ve gıda yoluyla, aile üyeleri (kişiden kişiye iletim) arasında doğrudan temas yoluyla, genellikle çocukluk çağında görülebilir¹⁷⁸. Gastrik kanser, dünyada en sık görülen kanserlerden biridir. Mide kanserlerinin yaklaşık %50'si Çin başta olmak üzere Doğu Asya'da görülmektedir¹⁸¹. Ancak, *H. pylori* gibi mide kanseri insidansı bölgeden bölgeye değişir. Standardize yaş insidans oranları, erkekler için Doğu Asya'da 42,4, Kuzey Amerika'da 5,8, kadınlar için Doğu Asya' da 18,3, Kuzey Amerika'da 2,8, Güney Afrika'da 2,2 arasında değişen ve Kuzey Afrika'da 3,9 oranında kadınlarda olduğu gibi erkeklerde yaklaşık iki kat yüksek olduğu bilinmektedir^{181,182}. Ortadoğu'da, İran' da mide kanseri insidansı İsrail (12.5/100 000 kişi, yılda) ve Mısır' a göre (3.4/ 100 000) daha çoktur.

Estimated age-standardised incidence rate per 100,000
Stomach: female, all ages



Estimated age-standardised incidence rate per 100,000
Stomach: male, all ages



Şekil 26. Global mide kanseri insidansı

Genel olarak, son elli yıl içinde gelişmiş ülkelerin çoğunda, mide kanseri insidansı düşmüştür ve son zamanlarda ABD' de en yaygın görülen 14. neoplazimdir. Ancak, pek çok gelişmekte olan ülkede, aynı dönemde mide kanseri insidansı artmıştır. Mide kanseri akciğer kanserinden sonra, dünyada her iki cinsten kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir¹⁸¹. En yüksek ölüm oranları Doğu Asya'da (erkeklerde 100.000'de 28.1, kadınlarda 100.000'de 13,0) ve Kuzey Amerika'da düşük mortalite oranı (erkeklerde 100.000'de 2.8, kadınlarda 100.000'de 1.5) tahmin edilmektedir. Beş yıllık sağkalım oranları Japonya dışında dünyanın birçok bölgelerinde yaklaşık % 20 ve erken tedavi ile bu oran % 60'a yaklaşmaktadır¹⁸³.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 01.10.2014 ve 20.05.2016 tarihleri arasında arasında kalan yaklaşık 20 aylık süre içerisinde, Türkiye ve İran' daki hastanelere gastrik yakınmalar ile başvuran ve histopatolojik tanı amaçlı gastrik biyopsi örnekleri alınarak parafin blokları hazırlanan ve Patoloji Ab.D laboratuvarlarında ince kesit preparatları hazırlanarak hematoxilen eosin ve gerekli diğer yöntemler ile boyanarak değerlendirilen örneklerden; a-Ç.Ü.Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvar arşivinden gastrik adenokarsinoma tanısı almış 80 hasta ile adenokarsinoma dışı aktif kronik gastrit tanısı almış 80 hasta b-İran Tebriz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D laboratuvar arşivinden adenokarsinoma tanısı almış 80 hasta ile yine adenokarsinoma dışı kronik aktif gastrit tanısı almış 80 hastaya ait olmak üzere toplam 320 formalinle fikse edilmiş gastrik biyopsi parafin bloklarından alınan 5µm kalınlığında kesilmiş ince kesitler moleküler yöntemler ile *H. pylori* insidansı ve *H.pylori*' ye ait kanser oluşumu ile ilişkilendirilmiş farazi virulans genleri ve polimorfizmleri değerlendirilmiştir. Çalışma örneklerin toplanması, parafin bloklardan dokunun çıkartılarak DNA ekstraksiyonu ve miktarlarının ölçülmesi ile PCR bazlı moleküler yöntemler ile hedef DNA fragmentlerinin tespiti ve doğrulanması adımları ile gerçekleştirildi.

3.1. Örneklerin Temini, taşınması ve Saklanması:

Çalışmada dahil edilen doku örnekleri, gastroduodenal patoloji çalışma protokolü çerçevesinde standardize edilmiş yöntemler ile Ç.Ü Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D. ile Tebriz Üniversitesi Tıp Fak.Patoloji Ab.D.'da değerlendirilmiş, histopatolojik olarak gastrik adenokarsinoma ve kronik gastrit tanısı almış, parafin bloklarda saklanan örnekler arasından seçilmiştir. Özel taşıma kapları içerisinde oda ısısında Ç.Ü Tıp Fakültesi T.Mikrobiyoloji AbD laboratuvarına getirilen örnekler çalışmaya başlanana kadar +4⁰ C de saklanmıştır.

3.2 Doku örneklerinin bloklardan çıkartılması ve DNA ekstraksiyonu:

Formalin ile fikse edilmiş gastrik doku kesitleri esas çalışmada DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu amacı ile kullanılacağından, doku ve DNA'yı denatüre etmekten mümkün olduğu kadar kaçınılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki protokol uygulanmıştır;

3.2.1 Deparafinizasyon İşlemi

1. Örnekler 58°C'de 2dk ısı bloğunda inkübe edildi.
2. Örneklerimizi içeren etiketlenmiş tüpe 1ml ksilen eklendi ve parafinin çözünmesi için 10-15 saniye vortekslendi.
3. Örnekler 7 dk maksimum hızda spin atılarak pellet oluşturuldu. Sonra pellete zarar vermeden ksilen supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Ksilen atığı uzaklaştırmak için bir polipropilen tüp kullanıldı.
4. Parafinin tamamı çözünene kadar 2.ve 3. basamak (ksilen yıkama) tekrarlandı (2 veya 3 yıkama).
5. 1 ml %100'lük ethanol eklendi, vortekslendi ve mikrosantrifüjde 14,000rpm'de 5-7 dakika spin atıldı. Pellete zarar vermeden ethanol süpernatant uzaklaştırıldı.
6. 1ml %70'lik ethanol eklendi (%100'lük ethanol distile suda dilue edildi), vortekslendi ve 14,000 rpm'de 7dk spin atıldı. Pellete zarar vermeden ethanol süpernatant uzaklaştırıldı.
7. 1ml %50'lik ethanol eklendi (%100'lük ethanol distile suda dilue edildi), vortekslendi ve 14,000 rpm'de 7dk spin atıldı. Ethanol pellete zarar vermeden pipetaj yapılarak, mümkün olduğunca dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
8. Son olarak, ethanol süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, tüpler kalan etanolün buharlaşması için açık tutuldu (5dk kuru-hava).

DNA ekstraksiyon prosedürü üretici firmanın talimatlarına göre QIAamp DNA Kit (Qiagen Inc., Germany) ile gerçekleştirildi ve hazırlanan DNA -20 °C'de saklandı.

3.3. Eksrakte DNA' nın saflığının değerlendirilmesi

Her bir örnek için toplam DNA miktarı ve saflığı (CHE BIOS UV/Vis) spektrofotometre ile değerlendirilmiştir. Örnekdeki DNA miktarı ng/μl olarak belirlenmiş ve protein kirlilikler için de A260 / 280 oranı hesaplanmıştır. A260 / A280 oranı değeri 1.7 – 2.0 olduğunda, DNA amplifikasyonu için yeterli olarak Kabul edilmiştir¹⁸⁴. Elde edilen DNA ekstraktları hedef dizilerin tespiti için PCR ile amplifiye edilene kadar -20 ° C'de saklanmıştır.

3.4. Hedef Dizilerin PCR ile Analizi

3.4.1 PCR ile Amplifikasyon:

Örneklerde öncelikle *H.pylori* varlığının tespiti için *glmM* (üreaz C) geni için spesifik primerlerin kullanıldığı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir¹⁸⁵. *H. pylori* pozitif örneklerde *cagA*, *cagE*, *cagT*, *cagG*, *cagM*, *vacA s1*, *vacA s2*, *vacA m1* ve *vacA m2* genlerin varlığını tespit amacı ile her bir hedef için spesifik sentetik kısa oligonükleotid dizilerinin (primerler) kullanıldığı PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir^{186,187,188,189}. PCR ile amplifikasyon için 0.5 ml'lik ependorf tüpler içerisinde kalıp DNA'da dahil toplam 25 μL master miks hacmi kullanılmıştır. Bütün amplifikasyon işlemleri MJ Mini BIO-RAD termalcycler cihazında gerçekleştirilmiştir. *H.pylori* için internal kontrol olarak *cagPAI*-pozitif *H. pylori* 26695 suşu kullanılmıştır^{185, 186}. Amplifikasyon işlemi için kullanılan primerler ve PCR siklusları Tablo1' de verilmiştir.

Tablo 1. Amplifikasyon işlemi için kullanılan primerler ve PCR aşamaları

Gene/ Primers	Sequence	PCR conditions	Size	References
<i>glmM</i>	F: AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T R: AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC	93°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min (35 cycles)	294 bp	186,188 and 190
<i>cag A</i>	F: GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G R: CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A	94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min (35 cycles)	349 bp	186, 188 and 24
<i>cag E</i>	F: TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC R: GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC	94°C, 1 min; 53°C, 45sec; 72°C, 45 sec (35 cycles)	508 bp	15,27, 28 And 191
<i>cag T</i>	F: CCATGTTTATACGCCTGTGT R: CATCACCACACCCTT TTGAT	94°C, 5 min; 57°C, 30 sec; 72°C, 1 min (35 cycles)	301 bp	186
<i>cag G</i>	F: GCCATGTTAACACCCCCTAG R: TTAATGCGCTAGAATAGTGC	94°C, 1 min; 54°C, 1 min; 72°C, 2 min (35 cycles)	497 bp	188
<i>cag M</i>	F: ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC R: ATTTTTCAACAAGTTAGAAAAAGCC	94°C, 1 min; 55°C, 1min; 72°C, 1min (35 cycles)	587 bp	188
<i>vacA s1</i>	F: GTC AGC ATC ACA CCG CAA C R: CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	94°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 1 min (35 cycles)	190 bp	192, 193 and 194
<i>vacA s2</i>	F: GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC R: CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	94°C, 1 min; 54°C, 1 min; 72°C, 2 min (35 cycles)	199 bp	193
<i>vacA m1</i>	F: GGTCAAAATGCGGTCATGG R: CCATTGGTACCTGTAGAAAC	95°C, 30 sec; 55°C, 30sec; 72°C, 4 min (35 cycles)	290 bp	184, 193
<i>vacA m2</i>	F: GGA GCC CCA GGA AAC ATT G R: CAT AAC TAG CGC CTT GCA C	94°C, 1min; 56°C, 30sec; 72°C, 4 min (35 cycles)	352 bp	184, 193

3.4.2. PCR Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Amplifikasyon işlemi sonunda her bir örnekten alınan 6µl amplikon, 5 µl / 100 mL etidyum bromür ihtivaeden 1X Tris-asetat-EDTA ile hazırlanan, % 2' lik agaroz jelde açılan kuyulara yerleştirildi. Jele açılan her iki uçtaki birer ve bir de ortada olmak üzere en az 3 kuyuya yine 6µl miktarında 100 bp DNA Ladder Plus marker ilave edildi. Yüklemeler tamamlandıktan sonra jel 120V da 20 dakika elektroforeze tabii tutuldu. Süre sonunda distile su ile yıkanan jeller görüntüleme cihazına yerleştirilerek (Gel logic 1500 imaging system, ayırım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) görüntülendi.



4. BULGULAR

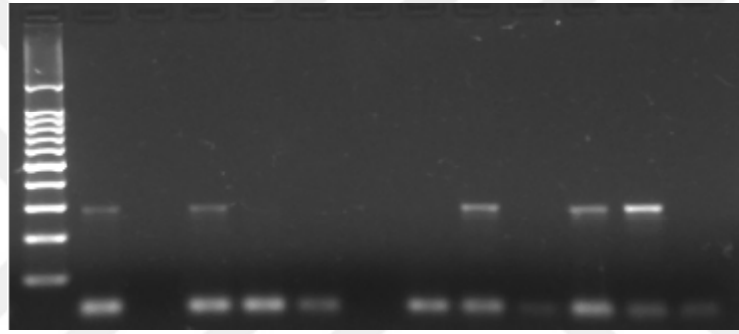
Bu çalışmada *H.pylori*'nin gastroduodenal patolojilerde gastrik mukozadaki kolonizasyon sıklığının tespiti ve insidans sıklığından hareketle epidemiyolojik olarak muhtemel ilişkinin ipuçlarının aranması kadar, *H.pylori*'ye ait farazi virulans faktörleri ve bu genlerdeki polimorfizmin histopatolojik değişimler üzerindeki muhtemel etkilerinin tespiti de amaçlanmıştır. Doğal olarak da gastrik mukozadaki histopatolojik değişikliklerin derecelendirildiği, ki gastrik infalamasyonun şiddeti, inflamatuvar hücrelerin çeşitliliği ve en nihayet gastrik mukoza hücrelerinde görülen değişimlerin skorlanarak tanı aldığı patoloji sonuçları bizim amacımıza uygun örneklerin tespiti için gerekli ve yeterliydi. Kaldı ki kendi tanı kriterlerimize göre değerlendirdiğimiz progressif bir çalışma, ki ne Mikrobiyolojik tanı yöntemleri ile ne de lezyonun endoskopik bakıda makroskopik bulgular ile skorlanması mümkün ve yeterli olmayacaktı.

Çalışmada Ç.Ü Tıp Fakültesi ve Tebriz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D arşivlerinde parafin bloklar içerisinde saklanmakta olan ve histopatolojik olarak hematoksilin-eozin ile boyalı preparatların incelenmesi sonucu, her iki kurumdan da eşit sayıda olmak üzere, 80'i gastrik adenokarsinom 80'i de kronik gastritli hastalara ait olmak üzere alınan toplam 320 örnek dahil edilmiştir.

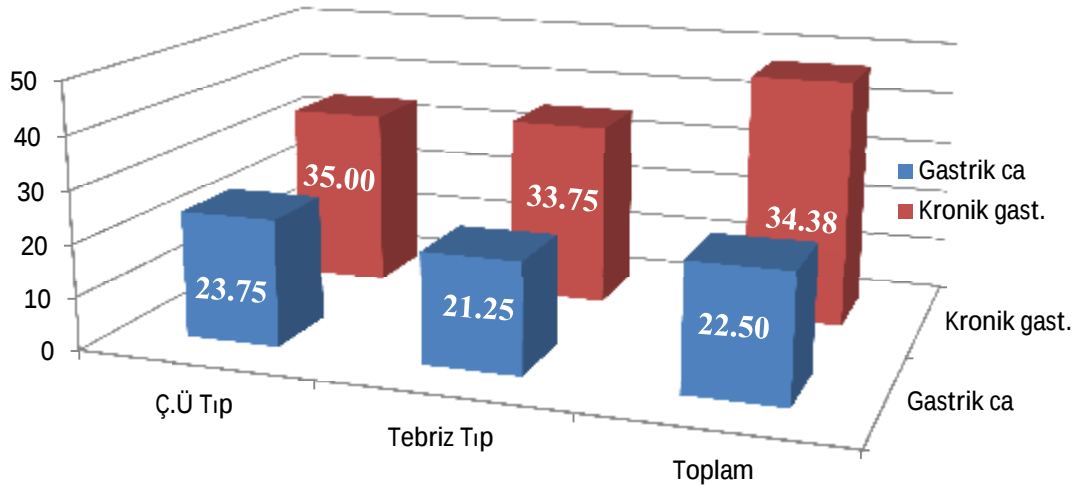
Gastrik biyopsi örneklerinin 91 (% 28.44)'inde *H.pylori* için spesifik olan *glmM* dizilerinin varlığı PCR ile yapılan amplifikasyon sonucunda belirlenmiştir. En yüksek orandaki *H. pylori* pozitifliği %35 ile Ç.Ü Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D'dan sağlanan kronik gastritli hastada örneklerinde görülürken en düşük orandaki pozitiflik %21.25 oran ile Tebriz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D'dan alınan gastrik adenokarsinomlu hastalardan elde edilmiştir (Tablo-2, Şekil 28).

Tablo 2. *H pylori glmM* pozitifliğinin merkez ve hasta gruplarına göre dağılımı.

Merkez	Histopatolojik tanı				Toplam	
	Gastrik kanser		Kronik Gastrit			
	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Ç.Ü Tıp	19	23.75	28	35.00	47	29.37
Tebriz Tıp	17	21.25	27	33.75	44	27.50
Toplam	36	22.50	55	34.38	91	28.44



Şekil 27. *glmM* nin (294 bp) elektroforez sonucu görüntüsü.

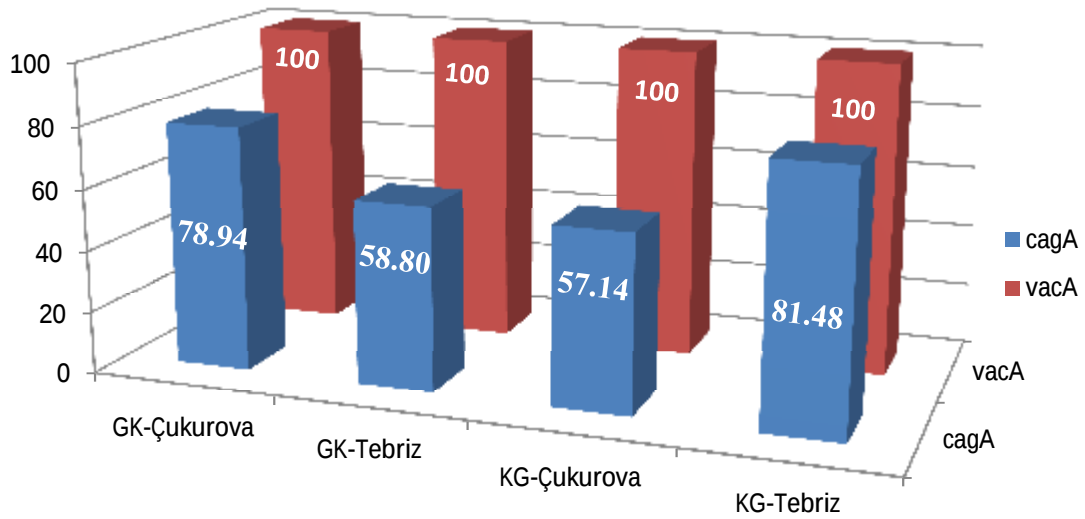


Şekil 28. *H pylori glmM* pozitifliğinin merkez ve hasta gruplarına göre dağılımı.

H.pylori pozitif hasta gruplarına ait biyopsi örneklerinde, *H.pylori* doku patolojisi ile ilişkilendirilen ve bizim de çalışmamızda değerlendirdiğimiz virülans faktörlerinden *vacA*' yı kodlayan *vacA*'nın hedef gen dizilerinin, her iki merkezden temin edilen örneklerde de, kronik gastritli ve gastrik kanserli, hasta örneklerinin tamamında pozitif olduğu, buna karşılık *cagA*' yı kodlayan *cagA*'nın ise % 81.48 (22/27) ile en yüksek oranda Tebriz' den alınan kronik gastritli hastalara ait örneklerde bulunduğu en düşük oranın ise % 57.14 (16/28) ile Çukurova bölgesi hastalarına ait örneklerde tespit edildiği görüldü(Tablo3).

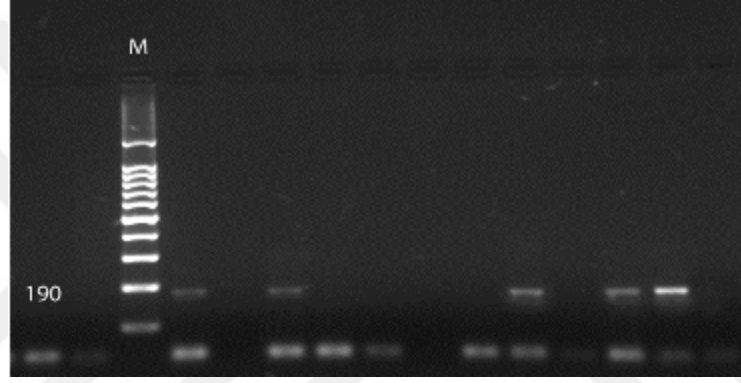
Tablo 3. Her iki merkezden temin edilen örneklerden izole edilen *cagA* ve *vacA* oranı

Merkez	Hedef dizi	Histopatolojik tanı				Toplam	
		Gastrik kanser		Kronik Gastrit			
		sayı	%	sayı	%	sayı	%
Ç.Ü Tıp	cagA	15	78.94	16	57.14	31	65.95
	vacA	19	100	28	100	47	27.50
Tebriz Tıp	cagA	10	58.80	22	81.48	32	72,72
	vacA	17	100	27	100	44	100

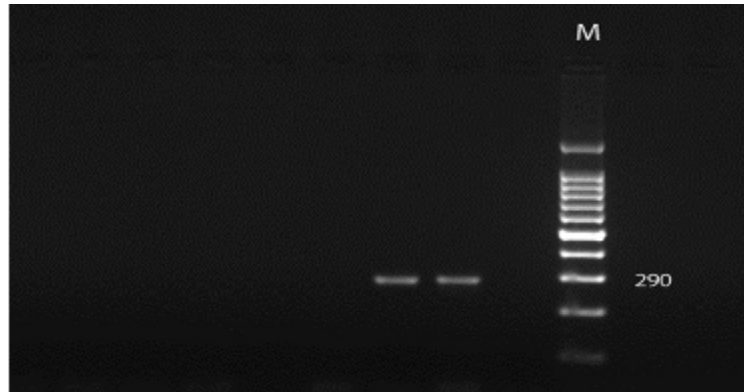


Şekil 29. *cagA* ve *vacA* pozitifliğinin merkez ve hasta gruplarına göre dağılımı.

vacA'nın “s” ve “m” allelerinin hücredeki histopatolojik değişiklikler için belirleyici özellik taşıdığı varsayımından hareket ile, bizde çalışmamızda *vacA*'nın allelik dağılımını ve bu allelerin *cagA* ile korelasyonunu değerlendirdik. Allel spesifik primerler kullanarak yaptığımız amplifikasyon çalışmasında en sık karşılaşılan alleli olan *s1m2*'nin 12 (%63.2) biyopsi örneği ile Çukurova bölgesi gastrik kanserli hasta örneklerinde tespit edildiği, en düşük sayıda pozitifliğinde 2 (%7.1) örnekdeki *s2m1* alleli ile yine Ç.Ü Tıp Fakültesi patoloji Ab.D.'den alınan Çukurova bölgesi kronik gastritli hasta biyopsilerine ait olduğu, her iki merkezden alınan gastrik kanserli hasta örneklerinden hiç birisinde “s2” allelinin bulunmadığı tespit edildi(Tablo4).



Şekil 30. *vacAs1*' in (190 bp) elektroforez sonucu görüntüsü



Şekil 31. *vacAm1*' in (290 bp) elektroforez sonucu görüntüsü

Tablo 4. Her iki merkezden temin edilen örneklerden izole edilen *vacA* genotiplerinin oranı

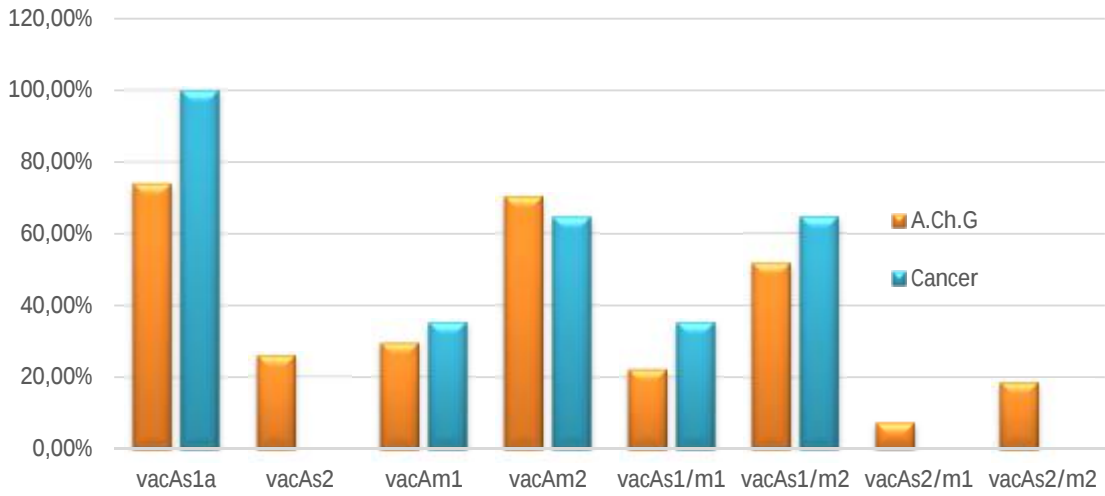
Histolojik	Merkez	<i>Allel</i>							
		<i>s1m1</i>		<i>s1m2</i>		<i>s2m1</i>		<i>s2m2</i>	
		sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Gastrik kanser	Ç.Ü	7	36.8	12	63.2	0	0	0	0
	T.Ü	6	35.3	11	64.7	0	0	0	0
Kronik gastrit	Ç.Ü	7	25	13	53.6	2	7.14	6	21.4
	T.Ü	6	22.2	14	51.8	2	7.4	5	18.5

vacA allellerinin *cagA*⁺ *H. pylori* suşlar arasındaki dağılımlarının değerlendirilmesi sonucunda ise her iki merkezden alınan her iki hasta grubundaki *vacA-s1m1* alleleline sahip örneklerin tamamının *cagA*⁺ *H. pylori* suşlar oldukları, Tebriz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Ab.D'dan alınan kronik gastritli hasta biyopsi örneklerinde de yine *cagA*⁺ *H. pylori* suşlar arasındaki *vacA-s1m2* ve *s2m1* allelik varyantların pozitiflik oranlarının % 100 olduğu yani bu allele sahip suşların tamamında *cagA*'nın pozitif olduğu tespit edilmiştir.(Tablo5, Şekil32a ve 32b).

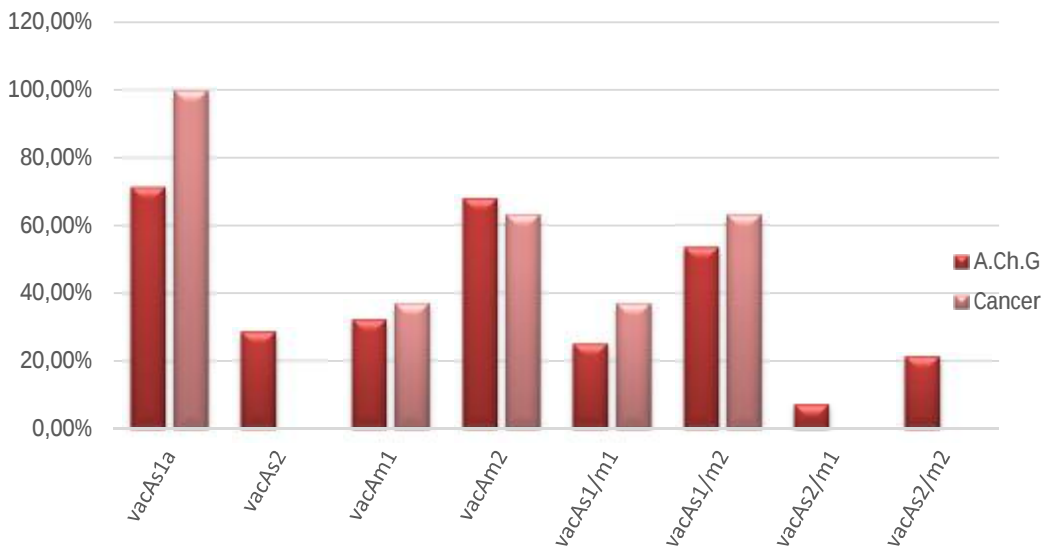
Tablo 5. *cagA*⁺ *H. pylori* pozitif bulunan biyopsi örneklerindeki *vacA* allellerinin dağılımı.

Histolojik	Merkez	<i>Allel</i>							
		<i>s1m1</i>		<i>s1m2</i>		<i>s2m1</i>		<i>s2m2</i>	
		sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Gastrik kanser	Ç.Ü	7/7	100	8/12	66.7	0	0	0	0
	T.Ü	6/6	100	4/11	36.4	0	0	0	0
Kronik gastrit	Ç.Ü	7/7	100	8/13	61.5	1/2	59	0/6	21.4
	T.Ü	6/6	100	14/14	100	2/2	100	5	18.5

Gastrik kanserli hastalarda *s1m2* oranı Çukurova ve Tebriz bölgesi örneklerinde sırası ile % 63.15 ve % 64.7 gibi oldukça yüksek oranlarda görülmesine karşılık bu suşlardaki *cagA* pozitiflik oranının yine sırası ile olmak üzere % 66.7 ve % 36.4 olarak bulunması *vacA s1m1* alleleline sahip *cagA*⁺ *H. pylori* suşlarının hücredeki patolojik değişimlerin evresinden bağımsız olarak *vacA s1m2* alleleline sahip *cagA*⁺ *H. pylori* pozitif suşlara göre daha yüksek oranda olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 32. a: Tebriz bölgesi aktif kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomali hasta biyopsi örneklerindeki *vacA* genotiplerinin dağılımının karşılaştırılması.



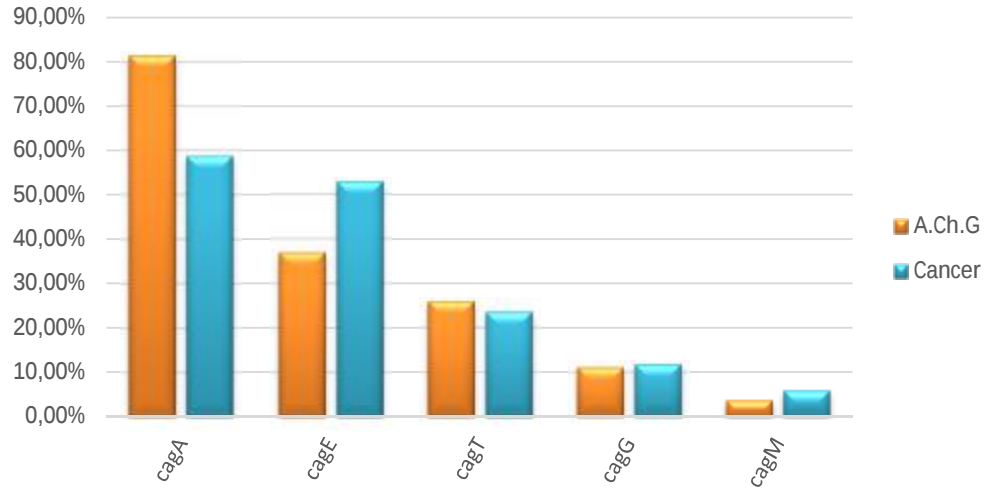
Şekil 33. b: Çukurova bölgesi aktif kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomali hasta biyopsi örneklerindeki *vacA* genotiplerinin dağılımının karşılaştırılması.

cag-PAI'da kodlanan ve *cagA*'nın konak hücre içerisinde translokasyonunda gerekli olan T4SS yapı proteinlerinden enfekte gastrik mukozadaki histopatolojik değişikliklerden sorumlu olabilecekleri iddia edilen konak hücreye bağlanma ve inflamatuvar cevabın ortaya çıkışından sorumlu tutulan genlerden *cagE* her iki merkezden alınan gastrik kanserli hasta gruplarına ait biyopsi örneklerinde, yine her iki merkezden alınan kronik gastritli hasta grubu biyopsi örneklerine göre istatistiki yönden anlamlı derecede ($p<0.05$) yüksek oranda pozitif bulunmuştur. *cagT* gen pozitifliğinin merkezler ve hasta grupları arasındaki dağılımında oransal olarak da bir fark tespit edilememesine karşılık, *cagG* ve *cagM* genleride ilginç bir şekilde yine bütün gruplarda değerlendirilemeyecek kadar düşük sayı ve oranda bulundukları ve bu 4 genin tamamının *cagA*⁺ *H. pylori* suşları oldukları görülmüştür (Tablo 6).

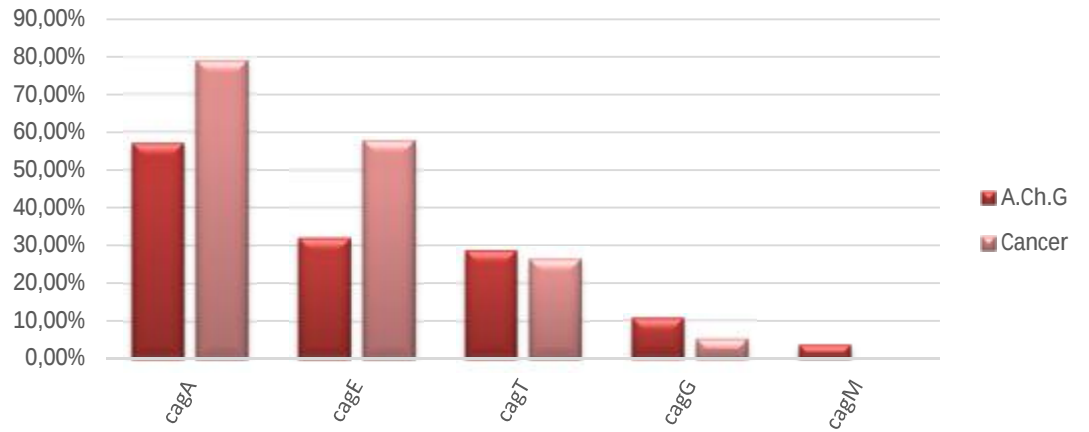
Tablo 6. *cagPIA* da kodlanan önemli bazı genlerin örneklerdeki oranları.

Histolojik	Merkez	<i>cag-PIA</i> da kodlanan genler							
		<i>cagE</i>		<i>cagT</i>		<i>cagG</i>		<i>cagM</i>	
		sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Gastrik kanser	Ç.Ü	11	57.9	5	26.3	1	5.3	0	0.0
	T.Ü	9	52.9	4	23.5	2	11.7	1	5.9
Kronik gastrit	Ç.Ü	9	32.1	8	28.6	3	10.7	1	3.6
	T.Ü	10	37.0	7	25.9	3	11.1	1	3.70

Biyopsi örneklerinin alındığı merkezler bazında *cag-PIA* genlerinin dağılımı karşılaştırılmış, *cagA*'nın Çukurova bölgesi gastrik kanserli hasta biyopsi örneklerinde kronik gastrite ve Tebriz bölgesi gastrik kanserli hasta biyopsi örnekleri oranlarına göre daha yüksek olmasına, karşılık *cagE*'nin her iki merkezden alınan gastrik kanserli hasta biyopsi örneklerinde kronik gastritli hasta örneklerine göre daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 33a ve 33b).

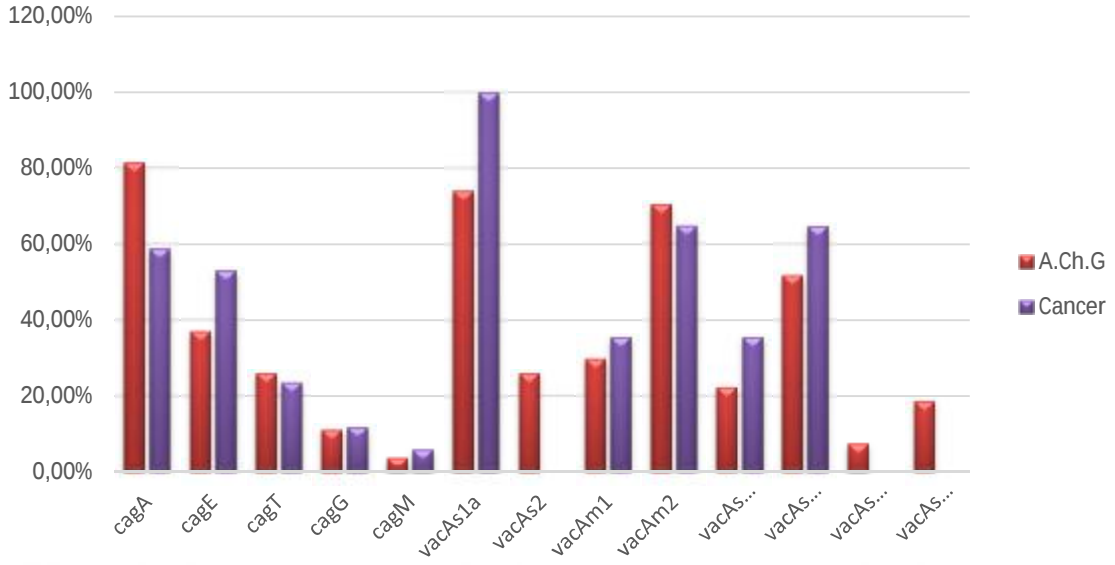


Şekil 34. a: Tebriz bölgesindeki kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki *cag-PAI* genlerinin dağılımının karşılaştırılması.

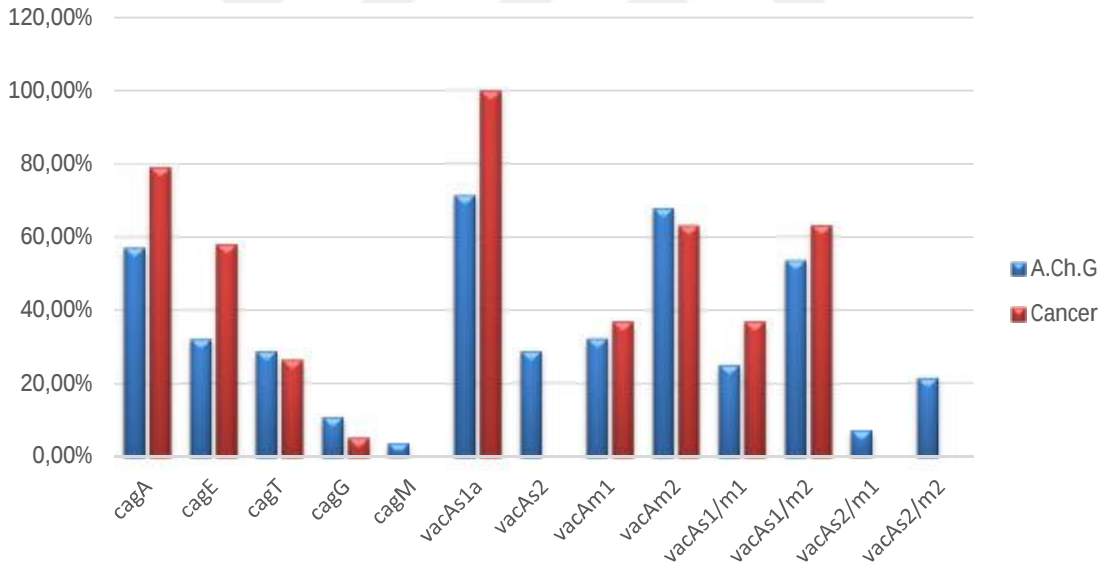


Şekil 35. b: Çukurova bölgesi kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hasta biyopsi örneklerindeki *cag-PAI* genlerinin dağılımının karşılaştırılması.

Çalışma sonunda elde edilen bulgular örnek merkezli olarak hasta gruplarına göre dağıtıldığında her iki bölgeden alınan örneklerde *vacS1m2*'nin, kanserli hasta grubunda ise Çukurova bölgesi hasta biyopsi örneklerindeki *cagA* yüksekliği dikkat çekici bulunmuştur (Tablo-7, Şekil-34a ve 34b).

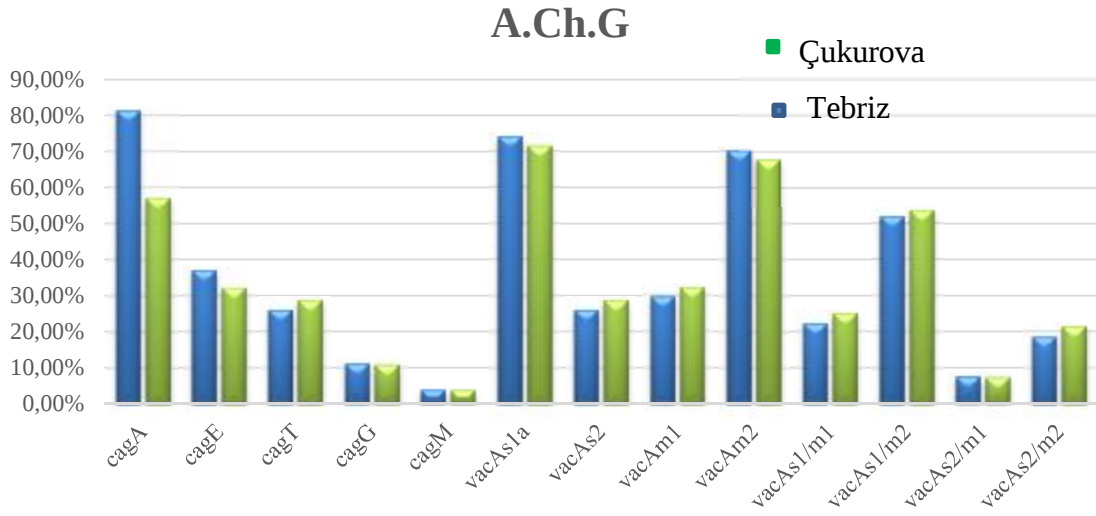


Şekil 36. a: Tebriz bölgesi kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomalı hasta biyopsi örneklerindeki *vacA* alleleri ile *cag*-PAI genlerinin dağılımının karşılaştırılması.



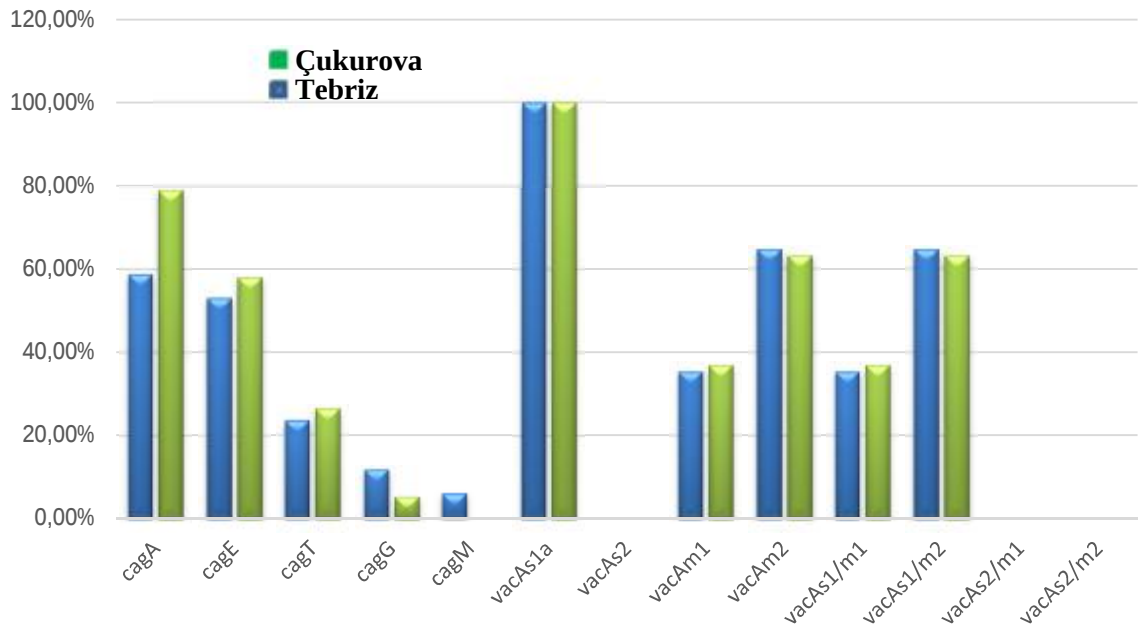
Şekil 37. b: Çukurova bölgesi hastalarındaki kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomalı hasta biyopsi örneklerindeki *vacA* alleleri ile *cag*-PAI genlerinin dağılımının karşılaştırılması.

Merkez bazında yapılan analizde kronik gastritli hasta biyopsi örneklerinde *cagA* Tebriz bölgesi örneklerinde Çukurova bölgesi örneklerine göre istatistiki derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuşken (Tablo-3, şekil-29) diğer farazi virulans faktörleri arasında fark görülmemiştir (Şekil-35).



Şekil 38. *H. pylori* virülans faktörlerinin aktif kronik gastritli hasta biyopsi örneklerindeki merkezlere göre dağılımı.

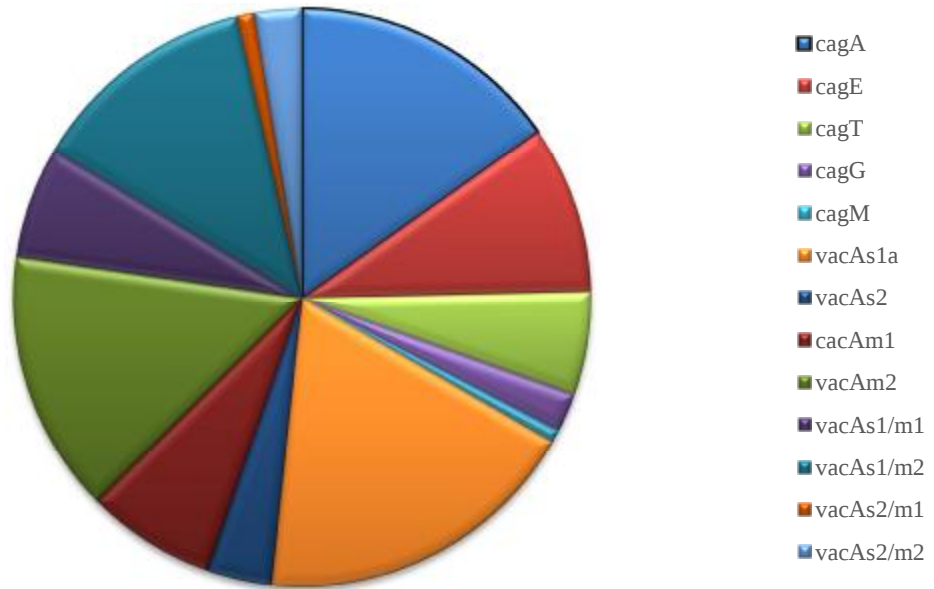
Buna karşılık gastrik kanserli hastalarda da çukurova bölgesi örneklerinde Tebriz örneklerine göre yine *cagA*’ pozitifliğinde istatistiki yönden önem gösteren fark tespit edilmiş (Tablo-3, şekil-29) diğer farazi virülans genlerinde fark tespit edilememiştir(şekil-36).



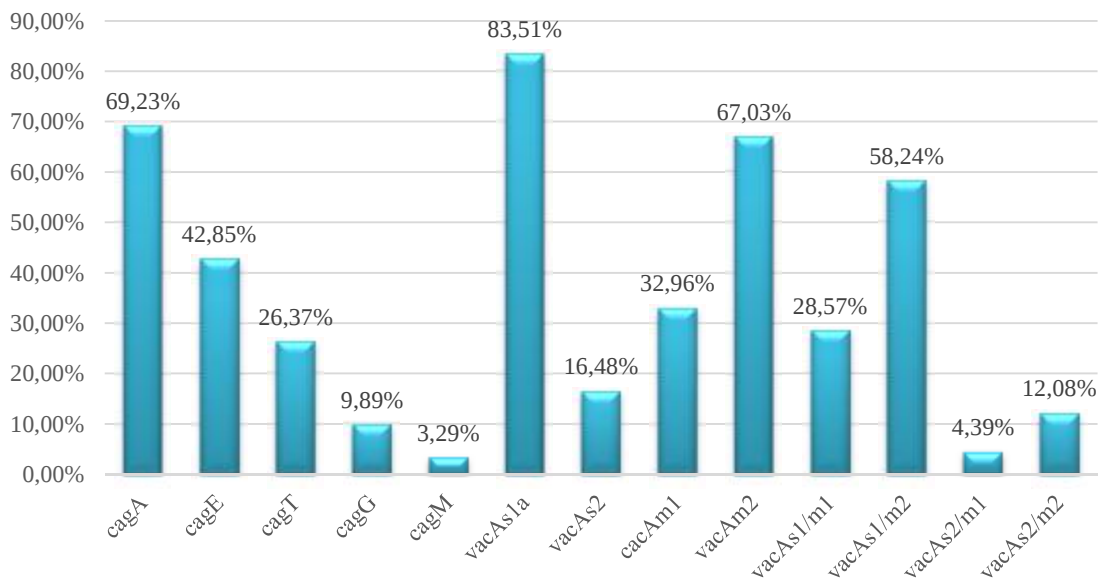
Şekil 39. Tebriz ve Çukurova bölgesi gastrik adenokarsinomalı hasta biyopsi örneklerinde ki *vacA* alleleri ile *cag* PAI genlerinin dağılımı.

Bu çalışma sonunda elde edilen verilerin tamamı merkez ve hasta grubu özelliği gözetilmeksizin değerlendirildiğinde *cagM*'in çok düşük oranda görülmesine karşılık *vacA* alleleri örneklerin tamamında pozitif bulunmuştur(Şekil-37a, şekil-37b,).

Hasta grupları dikkate aşıldığında *vacA*, *cagA* ve *cagM*'in kanser gruplarındaki yüksekliği istatistiki yönden önemli bulunmuştur(Tablo-7).



Şekil 40 a: Merkez ve hasta grubu farkı gözetmeksizin *H.pylori* genlerinin ortalama sıklığı.



Şekil 41. b: Merkez ve hasta grubu farkı gözetmeksizin *H.pylori* genlerinin ortalama sıklığı.

Tablo 7. Merkezler ve hasta gruplarına göre belirlenen *H.pylori* genlerinin dağılımı

Genotip	Aktif kronik Gastrit				Gastrik adenokarsinom				Toplam (n=91)
	İran (n=27)	Türkiye (n=28)	χ^2	P değeri	İran (n=17)	Türkiye (n=19)	χ^2	P değeri	
<i>cagA</i>	22 (81.48)	16 (57.14)	3.813	0.050	10 (58.8)	15 (78.94)	1.712	0.1907	63(69.23)
<i>cagE</i>	10 (37.0)	9 (32.1)	0.146	0.702	9 (52.94)	11 (57.89)	0.089	0.7652	39(42.85)
<i>cagT</i>	7 (25.92)	8 (28.57)	0.049	0.8257	4 (23.52)	5 (26.31)	0.037	0.8472	24(26.37)
<i>cagG</i>	3 (11.11)	3 (10.71)	0.002	0.9624	2 (11.76)	1 (5.26)	0.496	0.4811	9 (9.89)
<i>cagM</i>	1 (3.70)	1 (3.57)	0.001	0.9791	1 (5.88)	0	1.150	0.2836	3 (3.29)
<i>vacAs1</i>	20 (74.07)	20 (71.42)	0.049	0.8257	17 (100)	19 (100)	--	--	76 (83.51)
<i>vacAs2</i>	7 (25.92)	8 (28.57)	0.049	0.8257	0	0	--	--	15 (16.48)
<i>vacAm1</i>	8 (29.62)	9 (32.14)	0.041	0.8402	6 (35.29)	7 (36.84)	0.009	0.9231	30 (32.96)
<i>vacAm2</i>	19 (70.37)	19 (67.85)	0.041	0.8402	11 (64.70)	12 (63.15)	0.056	0.8134	61 (67.03)
<i>vacA s1/m1</i>	6 (22.22)	7 (25)	0.059	0.8085	6 (35.29)	7 (36.84)	0.009	0.9231	26 (28.57)
<i>vacA s1/m2</i>	14 (51.85)	13 (53.57)	0.016	0.8984	11 (64.70)	12 (63.15)	0.056	0.8134	53 (58.24)
<i>vacA s2/m1</i>	2 (7.40)	2 (7.14)	0.001	0.9699	0	0	--	--	4 (4.39)
<i>vacA s2/m2</i>	5 (18.51)	6 (21.42)	0.073	0.7874	0	0	--	--	11 (12.08)

5. TARTIŞMA

H. pylori'nin gastrik mukozadaki kolonizasyonunu tespit edildiği günden itibaren, bakterinin gastroduodenal patoloji, patojenite ile ilişkili muhtemel mekanizmalar, tedavi ve profilaksi ile korunma yollarının tanımlanması ve aydınlatılması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Özellikle 1994 yılında *H.pylori*'nin tip-I karsinojenler sınıfına dahil edilmesi, özellikle son derece yaygın olan ve dünya genelinde mortalitenin en sık görülen sebeplerinden birisi olan gastrik kanserler ve *H.pylori* çalışmalarına hız vermiştir¹⁴. Ancak mevcut epidemiyolojik bilgiler ışığında yapılan tahmini değerlendirmelere göre sağlıklı asemptomatiklerde % 60-90 gibi yüksek prevalansa sahip olan gastrik *H. pylori* kolonizasyonu, 10 yıllık bir sürede kolonize kişilerin % 8-10'unda bir gastroduodenal patoloji ile, gastroduodenal patoloji gelişenlerden de %2-4'ün de yine 10 yıllık bir periyotta gastrik adenokarsinoma ile sonlanabilmektedir. Soru: Son %2-4'e giren gruplar için belirleyici ve prediktiv tanı değeri taşıyan bakteriye veya konağa ait faktör veya faktörler var mıdır? Her asemptomatik taşıyıcılık neden gastrik malignitesi ile sonlanmıyor? Tip-I karsinojen tanımlamasının üzerinden yaklaşık olarak 22 yıl geçmiş olmasına rağmen; *H.pylori*'nin gastrik mukozadaki kolonizasyonunun premaliğnite için prediktiv bir bulgu sayılabileceği söylenebilir mi? Gastrik kanserden sorumlu özel suşlar veya virulans faktörleri var mıdır? Konak ve çevresel faktörler ile etkileşim malignitenin hangi evresinde şekillenir? Benzer çok sayıdaki çalışmada gibi bu projenin amacı da bu sorulara cevap aramak, en azından *H.pylori*'ye ait kanser oluşumu ile ilişkileri ispatlanmaya çalışılan farazi virulans faktörlerinin ön tanı için değerlerini araştırmaktır.

Gastrik kanserlerde dahil olmak üzere gastroduodenal hastalıkların patogeneğinde en çok suçlanan ve bu sebeple de üzerinde en çok çalışılan *H. pylori* virulans faktörü **cag PAI**'da kodlanan proteinler ve özellikle efektör protein **CagA** olmuş, gastrik mukozada **cagA** pozitif *H.pylori* kolonizasyonu, mevcut veya ileri de oluşabilecek muhtemel bir patolojik değişiklik için ön haberci olarak kabul edilmiştir. Patofizyolojik olayların izah edilmeye çalışıldığı ilk araştırmalarda gastrik biyopsi örneklerinde yoğun olarak **cagA** pozitif *H. pylori* suşlarının prevalansı araştırılmıştır. Bahreyn, İsrail ve Ürdün'de yapılan çalışmalarda **cagA** pozitif *H. pylori* prevalansı %25-60 arasında bildirilirken, Türkiye'nin de dahil olduğu Tayvan, Malezya ve Hindistan

gibi diğer bazı ülkelerde ise bu oranın % 60-80 arasında değiştiği bildirilmiştir¹⁹⁵. İran’ da, Tahran, Jahrom ve Tebriz’de, yapılan çalışmalarda **cagA** pozitifliğinin sırası ile % 62, % 92 ve % 68.7 gibi geniş bir aralıkta olduğu gösterilmiştir^{196,197,198,199}. Bu çalışmalarda kullanılan yöntemler ve seçilen hasta grupları standardize edilmediği için sonuçları bir metaanaliz sonucu olarak kabul etmek doğru olmayacaktır. Ancak gerek genel de gastrik mukozada *H. pylori* prevalansı gerekse *H. pylori* suşlarındaki **cagA** yani **cagPAI** pozitiflik oranları komşu iki ülke olan Türkiye ve İran’da büyük benzerlik göstermektedir¹⁸⁹. İyi komşuluk ilişkileri çerçevesinde turizm veya ticaret amaçlı insan hareketlerinin sık yaşandığı bu iki ülkede iklim, coğrafya ve beslenme alışkanlıkları arasında da büyük benzerlikler bulunmaktadır. Bu yakınlık özellikle bilinen en önemli bulaş kaynağı ve taşıyıcısı insan olan enfeksiyonların etyolojileri arasında da genotip düzeyinde bir benzerliği kaçınılmaz hale getirmektedir. Bu çalışmada iki ülkeden veya merkezden histopatolojik yönden aynı tanı yöntemleri ile değerlendirilmiş ve aynı tanıyı almış alınan hasta gruplarına ait biyopsi örneklerinin seçilmesindeki amaç çok tartışılan ve bakteriyel faktörlerin yanında kişiye ve çevreye ait faktörlerinde etkili olduğu düşünülen iki farklı coğrafyadaki *H. pylori* izolatlarının gastroduodenal patolojiye katkıları ve sahip oldukları farazi virulans faktörlerinin prevalansının tespiti amaçlanmıştır. Böylece birbirlerine bir mikroorganizmayı bulaştırma riski çok düşük olan ancak benzer çevre şartlarında yaşayan iki toplumdaki aynı hastalık gruplarında *H. pylori* prevalansı değerlendirilerek aynı genotiplerin patofizyolojik değişiklikler ile ilişkileri ortaya konmaya çalışılacak ve başta **cagA** olmak üzere **cagPIA**’da kodlanan genler ve proteinleri ile diğer virulans faktörleri içerisinde prognoz için ön tanı değeri taşıyanlar belirlenmeye çalışılacaktır.

Biz çalışmamızda kronik gastrit ve gastrik adenokarsinomlu hastalara ait eşit sayıdaki paraffin blok içerisinde saklanan gastrik biyopsi örneklerini kullandık. Çalışmada sağlıklı asemptomatik hastalara ait örnekler, her iki ülkede yapılan önceki prevalans çalışmalarından elde edilen sonuçlarının bilinmesi ve etik sebepler ile, özellikle yüksek prevalansa sahip ülkelerde asemptomatik hastalara endoskopi ve biyopsi işlemlerinin yapılmasının doğru olmayacağı düşüncesi ile, çalışılmamıştır.

Biyopsi örneklerinde, indikatör olarak kullanılan **glmM** dizilerinin varlığına göre yaptığımız değerlendirmede, *H. pylori* gastrik mukoza kolonizasyonun; Çukurova ve Tebriz bölgesi kronik gastritli hasta örneklerinde sırası ile % 35.00 ve 33.75 olmak

üzere ortalama olarak % 34.38, gastrik adenokarsinomlu hasta örneklerinde de yine sırası ile % 23.75 ve % 22.25 olmak üzere ortalama olarak % 22.50 oranlarında olduğu tespit edildi (Tablo 2). Her iki ülkeden farklı gruplar tarafından bildirilen asemptomatik prevalans değerlerinin çok altında olan oranlarımızın kendi içerisinde ülkeler ve vaka grupları arasında oldukça benzer olması dikkat çekicidir. Kronik gastritli vaka gruplarımızda, gastrik kanserli hasta gruplarımıza göre istatistiki yönden anlamlı olan prevalans farkımız; bu hastalık için *H. pylori* kolonizasyonunun gastrik kanserli hastalara göre daha anlamlı ilişki içerisinde olduğunu ima etse de, genel prevalans sonuçları dikkate alındığında: ne hasta grubu ne de gastrik adenokarsinomalar ile *H. pylori* kolonizasyonu arasındaki güçlü bir birlikteliği göstermemektedir. Ancak *H. pylori*'nin sadece gastrik hücrelerde adezyon gösterip ve kolonize olarak çoğalmasına karşılık gastrik adenokarsinomanın karakteristiği olan, intestinal veya diffüz tip hücre metaplazisi görülen alanlarda enfeksiyon oluşturup çoğalamaması, gastrik adenokarsinomalarda histopatolojik değişimlerin karakterize edildiği bu alanlardan alınan biyopsi materyallerinde *H. pylori*'nin gösterdiği düşük prevalans için bir izah olabilir. Fakat daha da önemlisi çalışılan biyopsi örneklerinin parafin bloklardan alınan ince kesitler olmasıdır. Fresh doku örnekleri ile yapılan PCR bazlı çalışmalarda daha büyük doku parçalarının kullanılması ve PCR ile amplifikasyon işleminde örnekde formalin veya ksilen gibi inhibitörlerin bulunması asemptomatik veya semptomatik gruplardaki yüksek prevalansın sebebidir. Oysa ister gastrik kanserli doku, ister kronik gastritli doku örnekleri parafin bloklar içerisine alınırken ve bloklardan çıkartılma işlemleri esnasında DNA'da oluşan hasar ve amplifikasyon karışımına karışan parafin blokdan gelen formaldehit veya ksilen gibi bazı enzim inhibitörleri amplifikasyon şansını azaltır ve prevalans gerçek oranının altında tespit edilebilir^{186, 200}. Bu sonuç çalışma planlanırken göze alınmış bir risk olup çalışmanın amacında "*H.pylori* prevalansı" olarak değil "*H.pylori* virulans faktörlerinin prevalansı" olarak belirlenmiştir.

Atasal olarak patates kanserinden sorumlu olduğu bilinen *A.tumefaciens* adlı bakteriden yayıldığı düşünülen *cagPAI*'in efektörü olan *cagA*'nın hücrelerde fosforilasyon yolu ile hücre içi sinyal yollarını bozduğu, hücreler arası bağların koparak hücrelerin şekillerinin bozulmasına, karakteristik kumru benzeri şekil almasına ve nihayet hücre ölümünü hızlandırarak ülseratif lezyonların oluşumuna sebep olduğu

gösterilmiştir. İster fizyolojik, ister sitotoksik ve immunolojik sebepler ile olsun biyolojik saatin bozulması buna karşılık kontrolsüz ve hızlı hücre rejenerasyonu ile ülseratif lezyonların tamiri çabasının, neoplastik transformasyon ve özellikle intestinal tip hücre metaplazisine sebep olacağı düşünülmüş ve gastroduodenal patoloji için **cagA**'nın önşart olduğu iddia edilmiştir. Bu açıdan değerlendirilerek **cagA**'nın yapısı ile epidemiyolojik sonuçlara dayalı klinik önemi çok sayıdaki çalışmada tartışılmıştır. Biz bu çalışmada **cagA**'nın hasta grupları içerisindeki prevalansını da hem **cagPAI**'ın indikatörü hem de patofizyolojik değişikliklerdeki muhtemel önemi açısından değerlendirdik. Çukurova kökenli *H. pylori* pozitifliği tespit edilen örneklerde **cagA**⁺ *H.pylori* prevalansımız kronik gastritli ve gastrik adenokarsinomali hastalarda sırası ile % 57.14 ve % 78.94 olmak üzere toplamda %67.7 iken (Tablo 5), bu oranlar Tebriz kökenli *H. pylori* pozitifliği tespit edilen hasta örnekleri için sırası ile; % 81.48, %58.8 ve % 67.05 olarak bulundu (Tablo 3). Burada ilginç olan iki sonuç dikkat çekicidir. Bunlardan ilki her iki hasta grubu için merkez bazlı ortalama prevalans oranlarının benzer olması, ki Çukurova bölgesi biyopsi örnekleri için %67.7 olan oran, Tebriz'den alınan örnekler için % 67.05 olarak bulundu, yani bu oranlar ve bölge bazında istatistiki önem arz eden bir fark yoktu. Bir diğer dikkat çekici bulguda Çukurova bölgesi gastrik adenokarsinomali hastalara ait biyopsi örneklerinde % 78.94 olan **cagA**⁺ *H. pylori* pozitifliğinin hem aynı bölgeden alınan kronik gastritli hastalarda elde edilen %57.14' lük orandan hemde Tebriz kökenli gastrik adeno karsinomali hastalardan elde edilen %58.8'lik orandan istatistiki yönden anlamlı derecede (p<0.05) yüksek olmasıydı (Tablo 5 ve 3). Buna karşılık Tebriz grubu hastalara ait örneklerden de kronik gastritli hastalardaki %81.48 lik **cagA**⁺ *H. pylori* oranı(Tablo 3) gerek bu bölgeden gerekse, gastrik kanserlilerde dahil olmak üzere, Çukurova bölgesinden temin edilen hasta gruplarına ait biyopsi örneklerinden elde edilen oranlardan, yine istatistiki yönden anlamlı olacak şekilde, yüksek bulundu. **cagA**⁺ *H. pylori* prevalansı bölgeler arasında değişiklik göstermektedir. Mesela çeşitli çalışmalarda Ortadoğu ülkelerinde **cagA**⁺ *H. pylori* prevalansı %50-60 arasında iken, Doğu Asya ülkelerinde hemen hemen izole edilen suşların tamamının **cagA**⁺ *H. pylori* olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de Saltık'ın ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada değerlendirdikleri 45 Helikobakter izolatında **cagA** pozitiflik oranının % 55.6 olduğunu ve **cagA**⁺ *H.pylori* kolonizasyonu ile gastroduodenal semptomlar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Bir başka çalışmada da Karaman ve arkadaşları **cagA⁺ H.pylori** ile peptik ülser hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlar ve *H.pylori* izolatları arasındaki **cagA** pozitiflik oranının da % 65.5 olduğunu bildirmişlerdir. İran’da yapılan çalışmalarda ise gastrik mukoza biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları arasında ise **cagA⁺ H.pylori** pozitiflik oranının % 44-91 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bizim her iki merkezden alarak değerlendirdiğimiz her iki hasta grubuna ait örneklerden elde ettiğimiz sonuçlarımız literatürde belirtilen ve gastroduodenal patolojilerden izole edilen **cagA⁺ H.pylori** suşlarındaki % 60-90'lere varan oranlar içerisinde. Ancak Çukurova bölgesini temsil eden Ç.Ü Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D’ndan alınan gastric karsinomalı hastalara ait örneklerdeki **cagA⁺ H. pylori** oranının kronik gastritlere ait örneklerden, Tebriz’ den alınan örneklerde de, kronik gastritli hastalara ait örneklerde gastrik kanserlilerin örneklerinden daha yüksek oranda **cagA⁺ H.pylori** pozitifliğinin tespiti aslında **cagA**’nın virülans için önemli olduğunu ancak tek başına prognozu belirlemek için yeterli olmadığını göstermektedir.

CagA proteininin sitotoksik özellik taşıması ve özellikle EPIYA motifini kodlayan kasetin büyüklüğü ile histopatolojik değişikliklerin şiddeti arasında kuvvetli ilişki bulunduğunun iddia edildiği dönemde hücre içerisinde özellikle nükleusa yakın bölgelerde vakuol oluşumuna yol açarak hücreyi apoptoza götürdüğü, biyolojik saati bozulan hücrelerin yerine ülserleşen alanı kapatmak üzere hızlı hücre proliferasyonu olduğu, bu hücrelerin de immunolojik kontrolden kurtulanlarının neoplastik değişimleri başlattığı düşünülmüş, özellikle **vacAs1m1** alleleline sahip genotiplerin daha virülan oldukları biyopsi bazlı çalışmalara dayandırılarak ileri sürülmüştü. Biz çalışmamızda **glmM** pozitif yani *H. pylori* pozitif bulunan biyopsi örneklerine ait DNA ekstraktlarının tamamında **vacA** varlığını tespit ettik. **vacA** house-keepin gen olup, **cagA** gibi aksesuar gen değildir ve bu sebeple normal şartlarda bütün *H.pylori* suşlarında bulunur, ancak gen ekspresyonu şarta bağlı olarak susturulabilir. Yani bütün suşlarda **vacA** bulunurken **VacA** bazı suşlarda sekrete edilmeyebilir. Bu sebeple genelde *H. pylori* pozitif örneklerdeki **vacA** bulgumuz normal şartlarda beklenen bir bulgudur. Biz **vacA s1m1** genotipinin oranını Çukurova ve Tebriz kökenli örneklerde gastrik kanserlerde sırası ile % 36.8 ve 35.3 olmak üzere birbirine yakın ve kronik gastritli örneklerden elde edilen yine sırası ile % 25 ve % 22 lik oranlardan nispeten daha yüksek olmakla beraber hasta grupları arasındaki pozitiflik oranlarının benzer olduğunu gördük(Tablo-4).

Ancak bu oranlar ***vacAs1m2*** genotipi için, gastrik kanserlilerde Çukurova ve Tebriz'den sağlanan biyopsi örneklerinde bu oranlar sırası ile 66.7 ve % 36.4 gibi sitatistiki yönden anlamlı olacak şekilde Çukurova grubunda daha yüksek bulundu. Buna karşılık kronik gastritlilerde ***s1m2*** allel pozitifliği Tebriz bölgesi örneklerinde % 100 olmak üzere % 61.5'lik orandan istatistiki yönden anlamlı olacak şekilde yüksekti. ***vacAs1m1*** genotiplerinin tamamının ***cagA⁺H.pylori*** pozitif bulunan örneklerde gösterilmesine karşılık ***vacAs1m2*** alleleline sahip genotiplerinin ***cagA⁺H. pylori*** suşlarda Çukurova ve Tebriz bölgesi gastrik kanser tanılı biyopsi örneklerinde sırası ile % 63.2 ve % 64.1, kronik gastrit örneklerinde de yine sırası ile % 53.6 ve % 51.8 oranlarında, kanserli gruplarda nispeten daha yüksek olmakla birlikte hasta grupları içerisinde son derece benzer oranlarda olduğu görüldü. Bu bulguların ışığında ***vacAs1m1*** pozitif suşların tamamının ***cagA⁺H. pylori*** suşlar olduğu bu sebeple bu suşların virülansının daha yüksek olabileceği söylenebilir, genel olarak ***vacAs1m2*** suşlarının yine bütün gruplarda ***vacAs1m1*** genotipinden daha yüksek oranda tespit edildiği bu yüksek oranım ***cagA⁺H. pylori*** suşlarda da ***vacA s1m1*** alleleline sahip olan ***cagA⁺H.pylori*** oranlarından daha yüksek oluşu, gerçekten ***vacA s1m2/cagA⁺H. pylori*** suşlarının ***vacA s1m1/cagA⁺H. pylori*** suşlarından daha aktif olduklarını, ***vacA s1m1/cagA⁺H. pylori*** suşlarının gastrik hücrede apoptozu daha güçlü şekilde provoke ederek enfekte hücrelerin gastrik metaplazi için neoplastik transformasyonuna izin vermeden programlanmış ölüm ile kendi kendilerini yok ettikleri, buna karşılık daha az aktif olan ***vacA s2m1/cagA⁺H. pylori*** suşları ile oluşan enfeksiyonlarda hücrelerin apoptoza yönlendirilemediği, sonuç da kronik enfeksiyon ve neoplastik transformasyon ve nihayetinde metaplaziye yatkınlığın arttığı söylenebilir. Diğer taraftan gastrik kanserli hastalardaki ***H. pylori*** virülans faktörlerinin pozitiflik oranlarının Tebriz'den alınan gastrik kanserli hastalara ait örneklerden elde edilen oranlardan daha yüksek oluşu, kanser oluşumunda suş özelliği kadar beslenme alışkanlıkları gibi çevresel faktörlerin, yaş, sigara, alkol ve anti inflamatuvarlar gibi gastrik mukozada kan akımını değiştirebilecek ilaçların kullanılması gibi kişisel faktörlerin ve lezzyonun yaşının prognoz etkileyeceği bilinmektedir.

Yaklaşık 30 yılı aşkın bir süredir yapılan ***cagA*** ve ***vacA*** ile ilgili biyopsi bazlı epidemiyolojik çalışmalar ile elde edilen verilerin, virülans ve doku patolojisi ilişkisini tatmin eder şekilde açıklığa kavuşturamamış olması, bakteriye ait başka faktörlerinde

prognozu etkileyebileceği şüphesini akla getirmiş, başta adezyon ile ilişkili hücre yüzey proteinleri olmak üzere çok sayıda yapısal eleman doku patolojisi ile ilişkisi yönünden çalışılmıştır. Bu bağlamda son yıllarda **CagE**'nin **CagA** gibi effektör protein olduğu ve gastrik epitele tutunmadan sorumlu olup, hücre yüzey proteinleri aracılığı ile hücrelerden interlökin-8 salgılanmasına yol açtığı gösterilmiştir. Çalışmamızda **cagE** ilginç olarak Çukurova ve Tebriz bölgesi gastrik kanser tanıli hasta biyopsi örneklerinde sırası ile % 57.9 ve % 52.9 oranlarında olmak üzere bu iki bölgeden alınan kronik gastrit tanıli hasta biyopsi örneklerinden elde edilen, sırası ile % 32.9 ve % 37.9'luk prevalans oranlarından istatistiki yönden anlamlı şekilde olamk üzere daha yüksek bulunmuştur. Lima V.P ve arkadaşları gastrik kanserli hastalara ait 110 fresh biyopsi örneği ile yaptıkları ve 94 örnek de *H. pylori* tespit ettikleri çalışmalarında, *H. pylori* pozitif örneklerden % 53'ünde **cagE** pozitifliği tespit etmişlerdir²⁰¹. Bu bulguları bizim gastrik kanserli hasta örneklerinden elde ettiğimiz bulgularımızın sınırları içerisinde. Çalışma sonunda **cagE**'nin tek başına veya **virB11** ile birlikte **cagPAI** ve kanser oluşumu için prediktif bir bulgu olabileceğini söylemişlerdir. Benzer bir çalışma sonucunda da Kocazeybek ve arkadaşları da **cagE**'nin diğer virülans faktörlerinden bağımsız olarak gastrik kanserler için prediktif değer taşıdığını söylemişlerdir.

cagPAI'nin konak hücre ile temasını sağlayan ve sekrete edilen proteinlerin uygunluğunu kontrol eden şeparon proteinler gibi çalışan **CagG**, **CagT** ve **CagM** proteinleri de çalışmamızda değerlendirildi. Ancak bütün gruplarda oldukça düşük oranlarda bulunan bu genlerin her hangi bir şekilde, bir bölgesel özellik veya gastroduodenal patoloji ile, yorumlanması mümkün olmadı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gastrik kanserler ve kronik gastritte hastalığın prognozunu etkilediği düşünülen *H.pylori* ve *H. pylori*'ye ait en çok speküle edilen farazi virulans genlerinin prevalansı ve bu genlerin suşlar arasında bölgesel fark gösterip göstermediğini tespit amacı ile planlanan ve İran ve Türkiye' daki iki merkezden, Ç.ÜTıp Fakültesi ve Tebriz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D, histopatolojik yönden değerlendirilerek tanı almış parafin blok içerisindeki gastrik biyopsi örneklerinin değerlendirildiği çalışma sonunda;

1. Parafin blokların önerilen tüm tekniklere rağmen *H.pylori*-PCR için düşük sensitivite gösterdiği,
2. Bu ön kabüle rağmen, kronik gastrit tanılı örneklerdeki % 34.58'lik *H. pylori* pozitiflik oranının gastrik kanserlilerde tespit edilen % 22.50'lik oran göre daha yüksek olduğu, sonuçların her iki merkezde de benzer olduğu, bunun kanser dokusundaki metaplazi alanlarında *H. pylori*'nin tutunup çoğalamamasının bir sonucu olabileceği,
3. *cagA*⁺*H. pylori* kolonizasyon oranlarının Çukurova bölgesinde gastrik kanserlilerde kronik gastritli hasta örneklerine göre istatistiki yönden anlamlı şekilde (sırası ile %78,95 ve %57.14, $p < 0.05$) yüksek bulunmasına karşılık Tebriz örneklerinde bu oranların tam tersine kronik gastritli örneklerde daha yüksek (sırası ile; % 58.80, % 81.48, $p < 0.05$) bulunması, *cagA*⁺*H. pylori* enfeksiyonunun prognoz için tek başına belirleyici olmadığı,
4. *vacA* geninin *H. pylori glmM* pozitif olan bütün örneklerde görülmesi bu genin house-keepin genlerden olmasının bir sonucu olduğu
5. *vacA* allel analizinde her iki merkezden alınan gastrik kanserli doku örneklerinde *vacAs1m1* ve *vacAs1m2* genotiplerinin kronik gastritli hasta örneklerine göre daha yüksek oranda görüldüğü, ayrıca *vacAs1m2* genotipinin de *vacAs1m1* genotipine göre daha yüksek prevalans oranına sahip olduğu, görülerek her iki merkez suşları arasında *vacA* genotiplerinin benzer oranda bulundukları ve *vacAs1m2* genotipinin baskın olduğu,

6. ***vacAs1m1*** allelik tiplerin bütün hasta gruplarında ***cagA⁺H. pylori*** suşlarında bulunmasına karşılık ***vacAs1m2*** allelik genotiplerin Tebriz'den alınan kronik gastritli hasta örneklerinin tamamında ***cagA⁺H. pylori*** suşları ile ilişkili olmasına karşılık diğer hasta örneklerinde %36.4-66.1 gibi değişen oranlarda ***cagA⁺H. pylori*** suşları ile ilişkili oldukları görülerek ***vacAs1m1*** 'in her iki merkezde de sadece ***cagA⁺H. pylori*** suşları ile ilişkili olmasının bu kombinasyonun yüksek virülansı için işaret sayılabileceği,
7. **cagPAI'** da kodlanan proteinlerden sadece ***cagE***'nin her iki merkezde de gastrik kanserli hastalarda kronik gastritli hastalara göre istatistiki yönden anlamlı şekilde sırası ile ; % 57.9 ve % 52.9, % 32.1 ve % 37.0 olam üzere daha yüksek oranda bulunduğu ve bu suşların tamamının ***cagA⁺H. pylori*** suşları oldukları görülerek, her ne kadar örnek sayısı ve örneğin doğasından kaynaklanan ***H. pylori*** pozitif örnek sayısı yeterli olmasada ***vacAs1⁺cagE⁺cagA⁺H. pylori*** suşların gastrik biyopsi örneklerindeki kolonizasyonunun tespiti malign prognoz için bir prediktif bulgu olarak değerlendirilebilir. Ancak bu güne kadar yapılan benzer amaca yönelik çalışmaların ortak sonucu olarak tam olarak belirlenememiş konak ve çevreye ait faktörlerden bağımsız olarak bu markerlara sahip suşların histopatolojik değişimlerden tek başına sorumlu olduğunu söylemek bu çalışma ilede mümkün olamamıştır. Yinede bu amaca yönelik olarak fresh doku örneklerinin kullanıldığı sekans bazlı yöntemlerin de kullanıldığı daha geniş vaka grupları ile yapılacak çalışmalar ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. **Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ.** *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *New England Journal of Medicine*. **2001** Sep 13; 345(11):784-9.
2. **Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, Camargo MC, Correa P.** Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. **2005** Nov 1; 54(11):1536-40.
3. **Nozaki K, Shimizu N, Inada KI, Tsukamoto T, Inoue M, Kumagai T, Sugiyama A, Mizoshita T, Kaminishi M, Tatematsu M.** Synergistic Promoting Effects of *Helicobacter pylori* Infection and High-salt Diet on Gastric Carcinogenesis in Mongolian Gerbils. *Japanese journal of cancer research*. **2002** Oct 1; 93(10):1083-9.
4. **Romero-Gallo J, Harris EJ, Krishna U, Washington MK, Perez-Perez GI, Peek RM.** Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. *Laboratory Investigation*. **2008** Mar 1;88(3):328-36.
5. **Brenner H, Arndt V, Stürmer T, Stegmaier C, Ziegler H, Dhom G.** Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. *Cancer*. **2000** Jan 15; 88(2):274-9.
6. **Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, Yamaoka Y, Berenson GS.** Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *The Lancet*. **2002** Mar 16; 359(9310):931-5.
7. **Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM.** Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*. **2012** May 1; 61(5):646-64.
8. **Ma JL, Zhang L, Brown LM, Li JY, Shen L, Pan KF, Liu WD, Hu Y, Han ZX, Crystal-Mansour S, Pee D.** Fifteen-year effects of *Helicobacter pylori*, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *Journal of the National Cancer Institute*. **2012** Jan 23.
9. **Plonka, Malgorzata, Aneta Targosz, and Tomasz Brzozowski.** Can Drinking Water Serve as a Potential Reservoir of *Helicobacter pylori*? Evidence for Water Contamination by *Helicobacter pylori*. **2014** Mar 16;359(9310):931-5..
10. **Doig P, de Jonge BL, Alm RA, Brown ED, Uria-Nickelsen M, Noonan B, Mills SD, Tummino P, Carmel G, Guild BC, Moir DT.** *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **1999** Sep 1; 63(3):675-707.
11. **Slipponen P, Kekki M, Haapakoski J, Ihämäki T, Siurala M.** Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: Statistical calculations of cross-sectional data. *International journal of cancer*. **1985** Feb 15;35(2):173-7.
12. **Amieva MR, El-Omar EM.** Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. **2008** Jan 31;134(1):306-23.
13. **Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S.** The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2004** Apr 6;101(14):5024-9.

14. **Ilver D, Arnqvist A, Ögren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T.** *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. **1998** Jan 16;279(5349):373-7.
15. **Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Ångström J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S.** *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. **2002** Jul 26;297(5581):573-8.
16. **Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K.** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. **1997** Aug 7;388(6642):539-47.
17. **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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2002** Oct 29; 99(22):14428-33.
18. **Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A.** *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1996** Dec 10; 93(25):14648-53.
19. **Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M.** EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. **2005** Jun 17; 280(24):23130-7.
20. **El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G.** Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. **2000** Mar 23; 404(6776):398-402.
21. **Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H.** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*. **1997** Mar 1; 23(6):1089-97.
22. **Groisman EA, Ochman H.** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*. **1996** Nov 29; 87(5):791-4.
23. **Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ.** Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. **1994** Jun 1; 62(6):2609-13.
24. **Allen LA, Schlesinger LS, Kang B.** Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *The Journal of experimental medicine*. **2000** Jan 3; 191(1):115-28.
25. **Wirth HP, Yang M, Karita M, Blaser MJ.** Expression of the human cell surface glycoconjugates Lewis x and Lewis y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status. *Infection and Immunity*. **1996** Nov 1; 64(11):4598-605.
26. **Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikström S, Sjöström R, Lindén S, Bäckström A, Lundberg C.** Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science*. **2004** Jul 23; 305(5683):519-22.
27. **Yamaoka Y.** Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol*. **2008** Jul 21; 14(27):4265-72.

28. **Bäckström A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Borén T, Arnqvist A.** Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2004** Nov 30; 101(48):16923-8.
29. **Magalhães A, Gomes J, Ismail MN, Haslam SM, Mendes N, Osório H, David L, Le Pendu J, Haas R, Dell A, Borén T.** Fut2-null mice display an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated *Helicobacter pylori* adhesion to gastric mucosa. Glycobiology. **2009** Dec 1; 19(12):1525-36.
30. **Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Ångström J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S.** *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. **2002** Jul 26; 297(5581):573-8.
31. **Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S.** Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science. **1993** Dec 17; 262(5141):1892-5.
32. **Marcos NT, Magalhães A, Ferreira B, Oliveira MJ, Carvalho AS, Mendes N, Gilmartin T, Head SR, Figueiredo C, David L, Santos-Silva F.** *Helicobacter pylori* induces β 3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. The Journal of clinical investigation. **2008** Jun 2; 118(6):2325-36.
33. **da Costa DM, dos Santos Pereira E, Rabenhorst SH.** What exists beyond cagA and vacA? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. World journal of gastroenterology: WJG. **2015** Oct 7; 21(37):10563.
34. **Åberg A, Gideonsson P, Vallström A, Olofsson A, Öhman C, Rakhimova L, Borén T, Engstrand L, Brännström K, Arnqvist A.** A repetitive DNA element regulates expression of the *Helicobacter pylori* sialic acid binding adhesin by a rheostat-like mechanism. PLoS Pathog. **2014** Jul 3; 10(7):e1004234.
35. **Oleastro M, Ménard A.** The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. Biology. **2013** Aug 27;2(3):1110-34.
36. **Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergström J, Borén T, Danielsson D, Teneberg S.** The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. Journal of Biological Chemistry. **2005** Apr 15; 280(15):15390-7.
37. **Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B.** Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. Nucleic acids research. **1999** Aug 1; 27(16):3325-33.
38. **Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K.** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. **1997** Aug 7;388(6642):539-47.
39. **Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY.** A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **2000** Jun 20; 97(13):7533-8.
40. **Saunders NJ, Peden JF, Hood DW, Moxon ER.** Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. Molecular microbiology. **1998** Mar 1;27(6):1091-8.
41. **Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, Crawford S, Odenbreit S, Haas R, Graham DY, Yamaoka Y.** Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and oipA gene switch status. Journal of clinical microbiology. **2004** May 1;42(5):2279-81.

42. **Lu H, Yamaoka Y, Graham DY.** *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. Current opinion in gastroenterology. **2005** Nov 1;21(6):653-9.
43. **Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y.** OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. Cellular microbiology. **2008** Apr 1;10(4):1008-20.
44. **Mai UE, Perez-Perez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD.** Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. Journal of Clinical Investigation. **1991** Mar;87(3):894.
45. **Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y.** *Helicobacter pylori*-Associated Regulation of Forkhead Transcription Factors FoxO1/3a in Human Gastric Cells. *Helicobacter*. **2012** Jun 1;17(3):193-202.
46. **Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, Wroblewski LE, Piazzuelo MB, Correa P, Peek RM.** Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. Cancer research. **2008** Jan 15;68(2):379-87.
47. **Loh JT, Torres VJ, Algood HM, McClain MS, Cover TL.** *Helicobacter pylori* HopQ outer membrane protein attenuates bacterial adherence to gastric epithelial cells. FEMS microbiology letters. **2008** Dec 1;289(1):53-8.
48. **Cao P, Cover TL.** Two different families of hopQ alleles in *Helicobacter pylori*. Journal of clinical microbiology. **2002** Dec 1; 40(12):4504-11.
49. **Ohno T, Sugimoto M, Nagashima A, Ogiwara H, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, Yamaoka Y.** Relationship between *Helicobacter pylori* hopQ genotype and clinical outcome in Asian and Western populations. Journal of gastroenterology and hepatology. **2009** Mar 1;24(3):462-8.
50. **Talebi Bezmin Abadi A, Mohabbati Mobarez A.** High prevalence of *Helicobacter pylori* hopQ II genotype isolated from Iranian patients with gastroduodenal disorders. Journal of pathogens. **2014** Feb 10; 2014.
51. **Belogolova E, Bauer B, Pempaiah M, Asakura H, Brinkman V, Ertl C, Bartfeld S, Nechitaylo TY, Haas R, Machuy N, Salama N.** *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. Cellular microbiology. **2013** Nov 1;15(11):1896-912.
52. **Blair DF.** Flagellar movement driven by proton translocation. FEBS letters. **2003** Jun 12;545(1):86-95.
53. **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. Journal of bacteriology. **1995** Jun 1;177(11):3010-20.
54. **Josenhans C, Vossebein L, Friedrich S, Suerbaum S.** The neuA/flmD gene cluster of *Helicobacter pylori* is involved in flagellar biosynthesis and flagellin glycosylation. FEMS microbiology letters. **2002** May 1;210(2):165-72.
55. **Schirm M, Soo EC, Aubry AJ, Austin J, Thibault P, Logan SM.** Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. Molecular microbiology. **2003** Jun 1;48(6):1579-92.

56. **Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL.** *Heterogeneity* in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infection and immunity*. **1998** Jul 1;66(7):3088-94.
57. **van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W.** Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. **1998** Jul 31; 115(1):58-66.
58. **Peek Jr RM, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG.** Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA* that is associated with clinical outcome. *Proceedings of the Association of American Physicians*. **1997** Dec; 110(6):531-44.
59. **Xu C, Li ZS, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Man XH.** Distribution of *cagG* gene in *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. *World journal of gastroenterology*. **2003** Oct;9(10):2258-60.
60. **Gatti LL, Módena JL, Payão SL, Smith MD, Fukuhara Y, Módena JL, de Oliveira RB, Brocchi M.** Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta tropica*. **2006** Dec 31;100(3):232-40.
61. **Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ.** Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. **1994** Jun 1;62(6):2609-13.
62. **Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ.** Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infection and immunity*. **1993** May 1;61(5):1799-809.
63. **Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Bmj*. **1998** May 16;316(7143):1507-10.
64. **Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor DE.** Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Molecular microbiology*. **1996** May 1;20(4):833-42.
65. **Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT.** *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*. **2010** Oct 1;23(4):713-39.
66. **Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A.** *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1996** Dec 10;93(25):14648-53.
67. **Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK.** Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *International Journal of Infectious Diseases*. **2008** Jan 31;12(1):30-6.
68. **Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A.** Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infection and Immunity*. **1995** Jan 1;63(1):94-8.
69. **Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, Aizawa SI.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*. **1998** Apr 24;280(5363):602-5.

70. **Lai CH, Perng CL, Lan KH, Lin HJ.** Association of IS605 and *cag*-PAI of *Helicobacter pylori* Isolated from Patients with Gastrointestinal Diseases in Taiwan. *Gastroenterology research and practice*. **2013** Feb 17;2013.
71. **Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, Rao LV, Habibullah CM, Sechi LA, Ahmed N.** Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. **2005** Dec 21;4(1):20.
72. **Malaquias LC, Falcao PL, Silveira AM, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, Pizzolo V, Souza CP, Colley DG, CORREA-OLIVEIRA R.** Cytokine Regulation of Human Immune Response to *Schistosoma mansoni*: Analysis of the Role of IL-4, IL-5 and IL-10 on Peripheral Blood Mononuclear Cell Responses. *Scandinavian journal of immunology*. **1997** Oct 1;46(4):393-8.
73. **Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P.** Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. **2006** Dec 31;20(4):651-74.
74. **Hueck CJ.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews*. **1998** Jun 1;62(2):379-433.
75. **Szkaradkiewicz A, Karpiński TM, Linke K, Majewski P, Rożkiewicz D, Goślińska-Kuźniarek O.** Expression of *cagA*, *virB/D* Complex and/or *vacA* Genes in *Helicobacter pylori* Strains Originating from Patients with Gastric Diseases. *PloS one*. **2016** Feb 11;11(2):e0148936.
76. **Zhou XR, Christie PJ.** Suppression of mutant phenotypes of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB11 ATPase by overproduction of VirB proteins. *Journal of bacteriology*. **1997** Sep 1;179(18):5835-42.
77. **Lai EM, Kado CI.** Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*. **1998** May 15;180(10):2711-7.
78. **Vergunst AC, Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, de Vlaam CM, Regensburg-Tuïnk TJ, Hooykaas PJ.** VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*. **2000** Nov 3;290(5493):979-82.
79. **Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N.** Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1993** Jun 15;90(12):5791-5.
80. **Lange C, Covacci A, Rappuoli R.** The CagT of *cag*, the pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, is a lipoprotein that assembles into a core system and requires CagM for stabilization. Submitted for publication. **1999**.
81. **Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T.** *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *The Journal of experimental medicine*. **2000** Feb 21;191(4):593-602.
82. **Smet A, Van Nieuwerburgh F, Ledesma J, Flahou B, Deforce D, Ducatelle R, Haesebrouck F.** Genome sequence of *Helicobacter heilmannii* sensu stricto ASB1 isolated from the gastric mucosa of a kitten with severe gastritis. *Genome announcements*. **2013** Feb 28; 1(1):e00033-12.
83. **Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M.** SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*. **2002** Jan 25;295(5555):683-6.

84. **Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A.** c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular microbiology*. **2002** Feb 1;43(4):971-80.
85. **Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M.** Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. **2006** Apr 30;130(4):1181-90.
86. **Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, Queiroz DM.** Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC microbiology*. **2011** Mar 24;11(1):61.
87. **Kawamura O, Murakami M, Araki O, Yamada T, Tomizawa S, Shimoyama Y, Minashi K, Maeda M, Kusano M, Mori M.** Relationship between gastric disease and deletion of cag pathogenicity island genes of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Digestive diseases and sciences*. **2003** Jan 1;48(1):47-53.
88. **Varda Brkić D, Katičić M, Bedenić B, Presečki Stanko A, Plečko V.** Detection of virulence gene belonging to cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates after multiple unsuccessful eradication therapy in Northwest Croatia. *Periodicum Biologorum*. **2016** Mar 16;118(1).
89. **Wang MY, Chen C, Gao XZ, Li J, Yue J, Ling F, Wang XC, Shao SH.** Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. *Microbial pathogenesis*. **2013** Jul 31;59:13-8.
90. **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*. **2003** Mar 1;47(6):1759-.
91. **Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C.** Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cellular microbiology*. **2003** Jun 1;5(6):395-404.
92. **Lei DH, Huang LP, Duan YJ, Guo G.** *Helicobacter pylori* chaperone-like protein CagT plays an essential role in the translocation of CagA into host cells. *Journal of microbiology and biotechnology*. **2012**; 22(10):1343-9.
93. **Lai CH, Perng CL, Lan KH, Lin HJ.** Association of IS605 and cag-PAI of *Helicobacter pylori* Isolated from Patients with Gastrointestinal Diseases in Taiwan. *Gastroenterology research and practice*. **2013** Feb 17;2013.
94. **Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M.** Determination of *Helicobacter pylori* Virulence by Simple Gene Analysis of the cagPathogenicity Island. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. **2001** Jan 1;8(1):181-6.
95. **Dong QJ, Wang Q, Xin YN, Li N, Xuan SY.** Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. **2009** Aug 28;15(32):3984-91.
96. **Mattar R, Marques SB, do Socorro Monteiro M, dos Santos AF, Iriya K, Carrilho FJ.** *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *Journal of medical microbiology*. **2007** Jan 1;56(1):9-14.
97. **Tiwari SK, Khan AA, Ahmed KS, ALI S, Ahmed I, Habeeb A, Kauser F, Hussain MA, Ahmed N, Habibullah CM.** Polymerase chain reaction based analysis of the cytotoxin associated gene pathogenicity island of *Helicobacter pylori* from saliva: an approach for rapid molecular genotyping in relation to disease status. *Journal of gastroenterology and hepatology*. **2005** Oct 1;20(10):1560-6.

98. **Pacheco AR, Proença-Módena JL, Sales AI, Fukuhara Y, Da Silveira WD, Pimenta-Módena JL, De Oliveira RB, Brocchi M.** Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. **2008** Nov 1;27(11):1053-9.
99. **Ko JS, Seo JK.** *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* in Korean children. *Helicobacter*. **2002** Aug 1;7(4):232-6.
100. **Pham KT, Weiss E, Soto LF, Breithaupt U, Haas R, Fischer W.** CagI is an essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL. *PloS one*. **2012** Apr 6;7(4):e35341.
101. **Rohde M, Püls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R.** A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system. *Molecular microbiology*. **2003** Jul 1;49(1):219-34.
102. **Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, Figura N, De Paoli P.** Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **2005** Nov 30;146(5):262-70.
103. **Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W.** Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *Journal of bacteriology*. **2008** Mar 15;190(6):2161-71.
104. **Terradot L, Waksman G.** Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *FEBS Journal*. **2011** Apr 1;278(8):1213-22.
105. **Lima VP, de Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, Rabenhorst SH.** The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *International Journal of Infectious Diseases*. **2010** Jul 31;14(7):e613-7.
106. **Alves MK, Lima VP, Ferrasi AC, Rodrigues MA, De Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH.** CDKN2A promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* *flaA* (+) strains in gastric adenocarcinomas. *Apmis*. **2010** Apr 1;118(4):297-307.
107. **Mizushima T, Sugiyama T, Kobayashi T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M.** Decreased Adherence of *cagG*-Deleted *Helicobacter pylori* to Gastric Epithelial Cells in Japanese Clinical Isolates. *Helicobacter*. **2002** Feb 1;7(1):22-9.
108. **Saito H, Yamaoka Y, Ishizone S, Maruta F, Sugiyama A, Graham DY, Yamauchi K, Ota H, Miyagawa S.** Roles of *virD4* and *cagG* genes in the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. *Gut*. **2005** May 1;54(5):584-90.
109. **Hsu PI, Hwang IR, Cittelly D, Lai KH, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Kim JG, Osato MS, Graham DY, Yamaoka Y.** Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *The American journal of gastroenterology*. **2002** Sep 1;97(9):2231-8.
110. **Tovey FI, Hobsley M, Holton J.** *Helicobacter pylori* virulence factors in duodenal ulceration: A primary cause or a secondary infection causing chronicity. *World journal of gastroenterology*. **2006**; 12(1):6-9.
111. **Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R.** Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. **2000** Feb 25;287(5457):1497-500.

112. **Stein M, Rappuoli R, Covacci A.** Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences. **2000** Feb 1;97(3):1263-8.
113. **Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Pestell RG, Blaser MJ, Chen CC.** Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. Cellular microbiology. **2006** Nov 1; 8(11):1740-52.
114. **Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Hosseini ME, Atherton JC.** A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. Gastroenterology. **2007** Sep 30;133(3):926-36.
115. **Nguyen VQ, Caprioli RM, Cover TL.** Carboxy-Terminal Proteolytic Processing of *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin. Infection and immunity. **2001** Jan 1;69(1):543-6.
116. **Saito Y, Murata-Kamiya N, Hirayama T, Ohba Y, Hatakeyama M.** Conversion of *Helicobacter pylori* CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21. The Journal of experimental medicine. **2010** Sep 27;207(10):2157-74.
117. **Molinari M, Galli C, de Bernard M, Norais N, Ruyschaert JM, Rappuoli R, Montecucco C.** The Acid Activation of *Helicobacter pylori* Toxin VacA: Structural and Membrane Binding Studies. Biochemical and biophysical research communications. **1998** Jul 20;248(2):334-40.
118. **Göttke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, Tong JZ, Nguyen TN, Fainsilber T, Hahn HH, Körber J.** Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. Journal of Infectious Diseases. **2000** May 1;181(5):1674-81.
119. **Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M.** Free recombination within *Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **1998** Oct 13;95(21):12619-24.
120. **Göttke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, Tong JZ, Nguyen TN, Fainsilber T, Hahn HH, Körber J.** Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. Journal of Infectious Diseases. **2000** May 1;181(5):1674-81.
121. **Letley DP, Lastovica A, Louw JA, Hawkey CJ, Atherton JC.** Allelic Diversity of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Gene in South Africa: Rarity of the *vacA s1a* Genotype and Natural Occurrence of an *s2/m1* Allele. Journal of clinical microbiology. **1999** Apr 1;37(4):1203-5.
122. **Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Peek Jr RM, Thompson SA, Hawkey CJ, Blaser MJ.** Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. Current microbiology. **1999** Oct 1;39(4):211-8.
123. **Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzalez-Valencia G, de León SP, Cravioto A, Atherton JC, López-Vidal Y.** Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. Journal of clinical microbiology. **1999** Sep 1;37(9):3001-4.
124. **Ricci V, Ciacci C, Zarrilli R, Sommi P, Tummuru MK, Blanco CD, Bruni CB, Cover TL, Blaser MJ, Romano M.** Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. Infection and immunity. **1996** Jul 1;64(7):2829-33.

125. **Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, Tytgat GN, van der Ende A.** The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *Journal of Infectious Diseases*. **1996** May 1;173(5):1171-5.
126. **Kuipers EJ.** *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **1997** Apr 1;11(S1):71-88.
127. **Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M.** Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1998** Oct 13;95(21):12619-24.
128. **Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ.** Immune response to *H pylori*. *World journal of gastroenterology*. **2006** Sep 21;12(35):5593.
129. **Mittal RK.** 21 Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease: Motility Factors. *The Esophagus*. **2011** Nov 29:405.
130. **Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Karlas A, Haimovich B, Backert S, Meyer TF.** The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cellular microbiology*. **2007** May 1;9(5):1148-61.
131. **Ye G, Barrera C, Fan X, Gourley WK, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE.** Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Clinical Investigation*. **1997** Apr 1;99(7):1628.
132. **Zhang S, Yanaka A, Tauchi M, Suzuki H, Shibahara T, Matsui H, Nakahara A, Tanaka N.** Hyperosmotic stress enhances interleukin-1 β expression in *Helicobacter pylori*-infected murine gastric epithelial cells in vitro. *Journal of gastroenterology and hepatology*. **2006** Apr 1;21(4):759-66.
133. **Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Joyoti BA, Kundu M.** Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochemical Journal*. **2002** Nov 15;368(1):121-9.
134. **Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C.** *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes and Infection*. **2003** Dec 31;5(15):1345-56.
135. **Chaturvedi R, Asim M, Lewis ND, Algood HM, Cover TL, Kim PY, Wilson KT.** L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. **2007** Sep 1;75(9):4305-15.
136. **Gobert AP, Cheng Y, Wang JY, Boucher JL, Iyer RK, Cederbaum SD, Casero RA, Newton JC, Wilson KT.** *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *The Journal of Immunology*. **2002** May 1;168(9):4692-700.
137. **Bussière FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, Wilson KT.** Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *Journal of Biological Chemistry*. **2005** Jan 28;280(4):2409-12.
138. **Lewis ND, Asim M, Barry DP, Singh K, de Sablet T, Boucher JL, Gobert AP, Chaturvedi R, Wilson KT.** Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. *The Journal of Immunology*. **2010** Mar 1;184(5):2572-82.

139. **Zychlinsky A, Fitting C, Cavaillon JM, Sansonetti PJ.** Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Journal of Clinical Investigation*. **1994** Sep;94(3):1328.
140. **Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF.** Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Jama*. **1991** Mar 13;265(10):1287-9.
141. **Kivi M, Tindberg Y, Sörberg M, Casswall TH, Befrits R, Hellström PM, Bengtsson C, Engstrand L, Granström M.** Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *Journal of clinical microbiology*. **2003** Dec 1;41(12):5604-8.
142. **Liu C, Russell RM.** Nutrition and gastric cancer risk: an update. *Nutrition reviews*. **2008** May 1;66(5):237-49.
143. **González CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, Tumino R, Panico S, Berglund G, Simán H, Nyrén O.** Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *International journal of cancer*. **2003** Nov 20;107(4):629-34.
144. **Tsugane S, Sasazuki S.** Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric cancer*. **2007** Jun 1;10(2):75-83.
145. **Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C.** Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. **2004** Oct 8;364(9441):1219-28.
146. **Nourae M, Pietinen P, Kamangar F, Dawsey SM, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR.** Fruits, vegetables, and antioxidants and risk of gastric cancer among male smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. **2005** Sep 1;14(9):2087-92.
147. **Ebert MP, Malfertheiner P.** Pathogenesis of sporadic and familial gastric cancer—implications for clinical management and cancer prevention. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **2002** Jun 1;16(6):1059-66.
148. **Rosero-Bixby L, Sierra R.** X-ray screening seems to reduce gastric cancer mortality by half in a community-controlled trial in Costa Rica. *British journal of cancer*. **2007** Oct 8;97(7):837-43.
149. **Redaniel MT, Laudico A, Mirasol-Lumague MR, Gondos A, Pulte D, Mapua C, Brenner H.** Cancer survival discrepancies in developed and developing countries: comparisons between the Philippines and the United States. *British journal of cancer*. **2009** Mar 10;100(5):858-62.
150. **Forman D, Burley VJ.** Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. **2006** Dec 31;20(4):633-49.
151. **Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V.** Epidemiology of stomach cancer. *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors*. **2009**:467-77.
152. **Park SH, Kangwan N, Park JM, Kim EH, Hahm KB.** Non-microbial approach for *Helicobacter pylori* as faster track to prevent gastric cancer than simple eradication. *World journal of gastroenterology: WJG*. **2013** Dec 21;19(47):8986.
153. **Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH.** Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. **2003** Dec 31;125(6):1636-44.

154. **Benamrouz S, Conseil V, Creusy C, Calderon E, Dei-Cas E, Certad G.** Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by *Cryptosporidium parvum* (Alveolata: Apicomplexa). *Parasite*. **2012** May 1;19(2):101-15.
155. **Misumi A, Murakami A, Harada K, Baba K, Akagi M.** Definition of carcinoma of the gastric cardia. *Langenbecks Archiv für Chirurgie*. **1989** Jul 1;374(4):221-6.
156. **Lee JY, Kim HY, Kim KH, Jang HJ, Kim JB, Lee JH, Kim DJ, Kim YB, Kim WJ, Yoo JY.** No changing trends in incidence of gastric cardia cancer in Korea. *Journal of Korean medical science*. **2003** Feb 1;18(1):53-7.
157. **Ekström AM, Hansson LE, Signorello LB, Lindgren A, Bergström R, Nyren O.** Decreasing incidence of both major histologic subtypes of gastric adenocarcinoma—a population-based study in Sweden. *British journal of cancer*. **2000** Jul;83(3):391.
158. **Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni JF, Correa P, Rosenberg PS, Rabkin CS.** Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *Jama*. **2010** May 5;303(17):1723-8.
159. **Camargo MC, Anderson WF, King JB, Correa P, Thomas CC, Rosenberg PS, Ehemann CR, Rabkin CS.** Divergent trends for gastric cancer incidence by anatomical subsite in US adults. *Gut*. **2011** May 25;gut-2010.
160. **Lauren P.** The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1965**;64:31-49.
161. **Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M.** A model for gastric cancer epidemiology. *The Lancet*. **1975** Jul 12;306(7924):58-60.
162. **Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H.** Trends in cancer incidence and mortality. *IARC scientific publications*. **1992** Dec(121):1-806.
163. **Davies GR, Banatvala N, Collins CE, Sheaff MT, Abdi Y, Clements L, Rampton DS.** Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology*. **1994** Jan 1;29(5):419-24.
164. **Clemens MR.** Free radicals in chemical carcinogenesis. *Klinische Wochenschrift*. **1991** Dec 1;69(21-23):1123-34.
165. **Kyrtopoulos SA.** Ascorbic acid and the formation of N-nitroso compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *American journal of clinical nutrition (USA)*. **1987**.
166. **Sun YQ, Söderholm JD, Petersson F, Borch K.** Long-Standing Gastric Mucosal Barrier Dysfunction in *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter*. **2004** Jun 1;9(3):217-27.
167. **Fedwick JP, Lapointe TK, Meddings JB, Sherman PM, Buret AG.** *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infection and immunity*. **2005** Dec 1;73(12):7844-52.
168. **Poplawski T, Chojnacki C, Czubatka A, Klupinska G, Chojnacki J, Blasiak J.** *Helicobacter pylori* infection and antioxidants can modulate the genotoxic effects of heterocyclic amines in gastric mucosa cells. *Molecular biology reports*. **2013** Aug 1;40(8):5205-12.
169. **Jackson AL, Loeb LA.** The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **2001** Jun 2;477(1):7-21.

170. **Houghton J, Macera-Bloch LS, Harrison L, Kim KH, Korah RM.** Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 β Up-Regulate Gastric Mucosal Fas Antigen Expression in *Helicobacter pylori* Infection. *Infection and immunity*. **2000** Mar 1;68(3):1189-95.
171. **Gologan A, Graham DY, Sepulveda AR.** Molecular markers in *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Clinics in laboratory medicine*. **2005** Mar 31;25(1):197-222.
172. **Bergman MP, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk BJ, D'Elis MM, Amedei A, Azzurri A, Benagiano M, Del Prete G.** The story so far: *Helicobacter pylori* and gastric autoimmunity. *International reviews of immunology*. **2005** Jan 1;24(1-2):63-91.
173. **Shimizu T, Marusawa H, Watanabe N, Chiba T.** Molecular Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastric Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*. **2015** Sep 30;44(3):625-38.
174. **Howden CW, Chey WD, Vakil NB.** Clinical Rationale for Confirmation Testing after Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Implications of Rising Antibiotic Resistance. *Gastroenterology & hepatology*. **2014** Jul;10(7 Suppl 3):1.
175. **Genta RM, Graham DY.** Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of H. pylori density and distribution. *Gastrointestinal Endoscopy*. **1994** Jun 30;40(3):342-5.
176. **Farzam A, Najafipour R, Johari P, Farivar TN.** Prevalence of *Helicobacter pylori* in Formaldehyde Fixed Paraffin Embedded Gastric Tissues of Gastric Cancer Patients by Scorpion Real-Time PCR Assay. *Biotechnology and Health Sciences*. **2014** Nov;1(3).
177. **Rabelo-Gonçalves E, Roesler B, Guardia AC, Milan A, Hara N, Escanhoela C, Almeida J, Boin I, Zeitune JM.** Evaluation of five DNA extraction methods for detection of *H. pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Pathology-Research and Practice*. **2014** Mar 31;210(3):142-6.
178. **Salih BA.** *Helicobacter pylori* infection in developing countries: the burden for how long?. *Saudi Journal of Gastroenterology*. **2009** Jul 1;15(3):201.
179. **Suerbaum S, Michetti P.** *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*. **2002** Oct 10;347(15):1175-86.
180. **Fock KM, Ang TL.** Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *Journal of gastroenterology and hepatology*. **2010** Mar 1;25(3):479-86.
181. **Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*. **2010** Dec 15;127(12):2893-917.
182. **Yang L, Parkin DM, Li L, Chen Y.** Time trends in cancer mortality in China: 1987–1999. *International Journal of Cancer*. **2003** Sep 20;106(5):771-83.
183. **Inoue M.** [Epidemiology and current trends in stomach cancer]. *Nihon Naika Gakkai zasshi. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine*. **2005** Jan;94(1):3-10.
184. **Alikhani MY, Arebestani MR, Khorasani MS, Majlesi A, Jaefari M.** Evaluation of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genotypes and Correlation With Clinical Outcome in Patients With Dyspepsia in Hamadan Province, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. **2014** Nov;16(11)..

185. **Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Dabiri H, Yamaoka Y, Bolfion M, Zojaji H, Aslani MM, Zali MR.** Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cag* pathogenicity island isolated from Iranian patients. *Digestive and Liver Disease*. **2009** Sep 30;41(9):634-8.
186. **Roesler BM, Zeitone JM.** From Gastritis to Gastric Cancer: The Importance of CagPAI of *Helicobacter Pylori* on the Development of Early and Advanced Gastric Adenocarcinoma. *Current Topics in Gastritis*. **2012** :224.
187. **Douraghi M, Mohammadi M, Shirazi MH, Oghalaie A, Kashani SS, Mohagheghi MA, Hosseini ME, Zeraati H, Esmaili M, Bababeik M, Mohajerani N.** Simultaneous detection of *cagA* and *cagE* of *Helicobacter pylori* strains recovered from Iranian patients with different gastroduodenal diseases. *Iranian J Publ Health*. **2009** Jan 1;38(2):98-105.
188. **Hsu PI, Hwang IR, Cittelly D, Lai KH, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Kim JG, Osato MS, Graham DY, Yamaoka Y.** Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *The American journal of gastroenterology*. **2002** Sep 1;97(9):2231-8.
189. **Nagiyev T, Yula E, Abayli B, Koksall F.** Prevalence and genotypes of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens from patients with gastroduodenal pathologies in the Cukurova region of Turkey. *Journal of clinical microbiology*. **2009** Dec 1;47(12):4150-3.
190. **Lei DH, Huang LP, Duan YJ, Guo G.** *Helicobacter pylori* chaperone-like protein CagT plays an essential role in the translocation of CagA into host cells. *Journal of microbiology and biotechnology*. **2012**;22(10):1343-9.
191. **Lima VP, de Lima Silva-Fernandes IJ, Alves MK, Rabenhorst SH.** Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. *Cancer epidemiology*. **2011** Oct 31;35(5):e32-7.
192. **Sedaghat H, Moniri R, Jamali R, Arj A, Zadeh MR, Moosavi SG, Rezaei M.** Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2*, and *oipA* genotypes in patients with upper gastrointestinal diseases. *Iranian journal of microbiology*. **2014** Feb;6(1):14.
193. **ERDOĞDU C, SARIBAŞ Z, YILMAZ YA.** Detection of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolates from a university hospital in Ankara region, Turkey. *Turkish journal of medical sciences*. **2014** Jan 20;44(1):126-32.
194. **Ozbey G, Demirel U, Aygun C, Ertas HB.** Investigation of the association between clinical outcome and the *cag* pathogenicity-island and other virulence genes of *Helicobacter pylori* isolates from patients with dyspepsia in Eastern Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2013** Dec;44(4):1267-74.
195. **Talebkhan Y, Mohammadi M, Mohagheghi MA, Vaziri HR, Hosseini ME, Mohajerani N, Oghalaie A, Esmaili M, Zamaninia L.** *cagA* gene and protein status among Iranian *Helicobacter pylori* strains. *Digestive diseases and sciences*. **2008** Apr 1;53(4):925-32.
196. **Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharya SK, Azuma T, Nair GB.** Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *Journal of bacteriology*. **2000** Jun 1;182(11):3219-27.
197. **Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M.** Genetic analysis of *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates and their relationship with gastroduodenal diseases in the west of Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. **2013** May;15(5):371.

198. **Ghotaslou R, Milani M, Akhi MT, Nahaei MR, Hasani A, Hejazi MS, Meshkini M.** Diversity of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genes and its relationship with clinical outcomes in Azerbaijan, Iran. *Adv Pharm Bull.* **2013** Jan 1;3(1):57-62.
199. **Vaziri F, Najar Peerayeh S, Alebouyeh M, Mirzaei T, Yamaoka Y, Molaei M, Maghsoudi N, Zali MR.** Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes in Iranian patients with different gastroduodenal disorders. *World J Gastroenterol.* **2013** Sep 14;19(34):5685-92.
200. **Rabelo-Gonçalves E, Roesler B, Guardia AC, Milan A, Hara N, Escanhoela C, Almeida J, Boin I, Zeitune JM.** Evaluation of five DNA extraction methods for detection of *H. pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Pathology-Research and Practice.* **2014** Mar 31;210(3):142-6.
201. **Lima VP, de Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, Rabenhorst SH.** The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int J Infect Dis.* **2010** Jul;14(7):e613-7.

ÖZGEÇMİŞ

11.04.1981 tarihinde İran’ da doğdu. İlköğrenimini Azimpouran İlkokulunda, ortaöğrenimini Jahani nesab de ve lise öğrenimini ise Shahid Beheshti’ de tamamladı. Tebriz Azad Üniversitesinde Veteriner Fakültesinde Veteriner hekimliğin 2005 yılında tamamladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

