

Kronik Gastrit ve Gastrik Kanserli Hastalarda *Helicobacter pylori* *iceA1* ve *iceA2* Genlerinin Araştırılması*

Investigation of *Helicobacter pylori* *iceA1* and *iceA2* Genes in Patients with Chronic Gastritis and Gastric Cancer

İhsan Hakkı ÇİFTÇİ¹, İhsan USLAN², Fatma Hüsniye DİLEK³, Gülşah AŞIK¹,
Mihrican Aydın ÖZGÜR³, Osman Nuri DİLEK⁴

¹ Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

¹ Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Afyonkarahisar, Turkey.

² Afyon Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

² Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Afyonkarahisar, Turkey.

³ Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

³ Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine, Department of Pathology, Afyonkarahisar, Turkey.

⁴ Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

⁴ Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Afyonkarahisar, Turkey.

* Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir
(No: 07.TIP.05).

Geliş Tarihi (Received): 13.07.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.01.2011

ÖZET

Helicobacter pylori enfeksiyonlarının patogeneğinde, bakteriye ait çok sayıda virülans faktör rol oynamaktadır. *H.pylori*'nin gastrik mukozaya tutunması sırasında, epitelyum ile temas halinde indüklenen bir gen olan *iceA* (induced by contact with epithelium A) iki varyanta (*iceA1* ve *iceA2*) sahiptir. *H.pylori* suşlarında *iceA1* varlığı ile peptik ülser arasında anlamlı bir ilişki olabileceği ifade edilmekle birlikte bu konuda ortak bir görüş mevcut değildir. Bu çalışmada, kronik gastrit ve gastrik kanser tanısı alan hastaların doku örneklerinde *H.pylori* *iceA1* ve *iceA2* gen bölgelerinin varlığı ve prevalansının araştırılması, klinik görünümler ile genotipler arasındaki ilişkinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, histopatolojik olarak biyopsi örneklerinde *H.pylori* saptanan 55'i kronik gastrit, 54'ü ise gastrik kanserli olmak üzere toplam 109 hastaya ait doku örneği dahil edilmiştir. Tüm örneklerde *H.pylori* varlığı, "in house" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *ureA* gen bölgesinin amplifikasyonu ile doğrulanmıştır. Gastrik biyopsi örneklerinde *iceA1* ve *iceA2* gen bölgeleri, özgül primerler kullanılarak doğrudan PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışma-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. İhsan Hakkı Çiftçi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir Yolu, 03100, Afyonkarahisar, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 505 274 7077, **E-posta (E-mail):** ihciftci@hotmail.com

ya alınan tüm olguların %58 (63/109)'ünde *iceA1*, %24 (26/109)'ünde ise *iceA2* genotipi tespit edilmiştir. Kronik gastrit ve gastrik kanserli olgularda *iceA1* gen varlığı sırasıyla; %51 (28/55) ve %65 (35/54), *iceA2* gen varlığı ise sırasıyla %20 (11/55) ve %28 (15/54) olarak bulunmuştur. Hasta grupları arasında *iceA1* ve *iceA2* pozitiflik oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış ($p > 0.05$); *iceA1* ve *iceA2* varlığı ile klinik hastalık tablosu arasında bir ilişki bulunmamıştır ($r > 0.01$). Sonuç olarak, bölgemizdeki kronik gastrit ve gastrik kanserli hastalarda *H. pylori iceA1* genotipinin baskın (%58) olduğu görülmüş, *iceA2* genotipinin ise literatürdeki verilere benzer olarak daha düşük oranda (%24) olduğu izlenmiştir. Verilerimiz, *iceA* geninin, *H. pylori* için klinik tabloyu ve virülansı belirlemekten ziyade coğrafi farklılıkları yansıtmakta olduğu fikrini desteklemektedir. Ülkemizde bu konu ile ilgili çok merkezli ve geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*; virülans faktör; *iceA1*; *iceA2*; kronik gastrit; gastrik kanser.

ABSTRACT

Several virulence factors of *Helicobacter pylori* play crucial role in the pathogenesis of the infections. *H. pylori iceA* gene which is induced by the contact with epithelium during the attachment of bacterium to the gastric mucosa, possess two variants (*iceA1* and *iceA2*). Although there are some data indicating the relationship between *H. pylori iceA1* and peptic ulcer, this concept is still controversial. The aims of this study were to investigate the presence and prevalence of *H. pylori iceA1* and *iceA2* gene regions in the tissue samples of patients diagnosed as chronic gastritis and gastric cancer, and to evaluate whether any correlation existed between these genotypes and clinical manifestations. A total of 109 tissue samples obtained from chronic gastritis (n= 55) and gastric cancer (n= 54) patients whose *H. pylori* infections have been confirmed by histopathologic examination of biopsy samples, were included in the study. The presence of *H. pylori* in the samples were also confirmed by amplification of the *ureA* gene region by in-house polymerase chain reaction (PCR). *H. pylori iceA1* and *iceA2* genes were directly genotyped with the use of specific primers in the gastric biopsy specimens by PCR. The total positivity rates of *iceA1* and *iceA2* genotypes in patients were found as 58% (63/109) and 24% (26/109), respectively. With the special attention to chronic gastritis and gastric cancer patients, the frequencies of *iceA1* gene were 51% (28/55) and 65% (35/54), while the frequencies of *iceA2* gene were 20% (11/55) and 28% (15/54), respectively. The difference of positivity rates of *iceA1* and *iceA2* genotypes between the patient groups were not statistically significant ($p > 0.05$). There was also no statistically significant correlation between the genotypes and clinical manifestation ($r > 0.01$). As a result, *H. pylori iceA1* genotype was predominant (58%) in chronic gastritis and gastric cancer patients in our region, however the prevalence of *iceA2* genotype was lower (24%) similar to those data reported in the literature. Our results supported the concept that *iceA* gene reflects geographical differences rather than determining the clinical picture and virulence. In conclusion, multicenter and large scaled studies are needed for better evaluation of *H. pylori iceA* gene and disease relationship.

Key words: *Helicobacter pylori*; virulence factor; *iceA1*; *iceA2*; chronic gastritis; gastric cancer.

GİRİŞ

Helicobacteriaceae ailesinde, insan ve hayvanların midesine yerleşebilen, hareketli, gram-negatif, mikroaerofilik bakteriler yer almaktadır. Bu ailenin insan için en önemli üyesi *Helicobacter pylori* olup, enfeksiyonun tedavi edilmemesi durumunda kronikleşme söz konusu olmaktadır. *H. pylori*'nin hem lokal inflamasyon hem de sistemik olarak hümmoral immün yanıt oluşturmaları nedeniyle, enfeksiyonların tanısında histopatolojik inceleme, hızlı üreaz testi, üre nefes testi, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır^{1,2}.

Enfeksiyonun en önemli bulaş yolu fekal-oral olmakla birlikte, farklı geçiş yollarının da bulunduğu ifade edilmektedir³. Gelişmiş ülkelerde erişkinlerin %50'si, gelişmekte olan ülkelerde ise toplumun %80-90'ı *H.pylori* ile enfekte olmaktadır. Yapılan çalışmalarda gastrik ülser, duodenal ülser, MALT (gastrik mukosa associated lymphoid tissue) lenfoması ve distal gastrik kanserde *H.pylori*'nin majör etyolojik rolü olduğu vurgulanmaktadır^{3,4}.

H.pylori suşları ile enfekte olan birçok bireyde peptik ülserin gelişmemesi ve bunların asemptomatik kalması, peptik ülser gelişiminde başka faktörlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda, peptik ülserli hastalardan izole edilen suşlarda, bakterinin gastrik mukozaya tutunması sırasında indüklenen bir gen olduğu saptanmıştır^{5,6}. Epitelyum ile temas halinde indüklenen bu gen "*iceA*" (induced by contact with epithelium A) olarak adlandırılmış ve iki varyanta (*iceA1* ve *iceA2*) sahip olduğu belirlenmiştir⁷. *H.pylori* suşlarında *iceA1* varlığı ile peptik ülser arasında anlamlı bir ilişki olabileceği ifade edilmekle birlikte bu konuda ortak bir görüş mevcut değildir⁵⁻⁹.

Bu çalışmada, Afyonkarahisar bölgesinde kronik gastrit ve gastrik kanser tanısı alan hastaların doku örneklerinde *H.pylori iceA1* ve *iceA2* gen bölgelerinin varlığı ve prevalansının araştırılması, klinik görünümle ile genotipler arasındaki ilişkinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, Haziran 2007-Aralık 2008 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji/Genel Cerrahi polikliniklerine başvuran, dispeptik yakınmaları olan, son bir ay içinde bu sebeple tedavi almamış, endoskopik gastrik biyopsi uygulanmış kronik gastritli 55 hastanın antrumunun farklı bölgelerinden alınan biyopsi örneği ile opere edilen 54 gastrik kanserli hastaya ait rezeksiyon materyalleri retrospektif olarak değerlendirmeye alındı. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirilen çalışmaya, histopatolojik olarak *H.pylori* pozitif bulunan örnekler dahil edildi. Tüm örneklerde *H.pylori* gen bölgeleri "in house" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı.

Hastalardan alınan biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra *H.pylori*ye özgül *ureA* gen bölgesini hedefleyen F; GCCAATGGTAAATTAGTT ve R; CTCCTTAATTGTTTTTAC primer çifti, *iceA1* için F; "GTGTTTTTAACCAAAGTATC" ve R; "CTATAGCCATTATCTTTGCA" primer çifti ile *iceA2* için F; "GTTGGGTATATCACAATTTAT" ve R; "TTTCCCTATTTCTAGTAGGT" primer çiftleri kullanıldı⁷. PCR reaksiyonu; PCR tamponu (5 µl), 25 mM MgCl₂ (4 µl), 25 mM dNTP (0.2 µl), 10 pmol primer (1.5 µl), TaqDNA polimeraz (0.5 µl), DNaz bulunmayan distile su (33.8 µl) ve yaklaşık 10 ng/µl olacak şekilde örnek DNA'sı (5 µl) şeklinde toplam hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR programı ısı döngü cihazında (Techne Genius, Rhys Scientific, İngiltere), 95°C'de 5 dakika, 95°C'de 15 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 45 saniye olmak üzere toplam 40 döngü uygulandı⁷. Elde edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde (Sigma, ABD) elektroforeze tabi tutuldu ve etidyum bromür ile boyanarak, uygun büyüklükte

bantların oluşumu moleküler ağırlık belirteci (Fermentas 1 kb ladder, ABD) ile karşılaştırılarak UV altında değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme, SPSS programı kullanılarak Pearson ki-kare ve korelasyon testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, histopatolojik olarak biyopsi örneklerinde *H. pylori* saptanan 55'i kronik gastrit, 54'ü gastrik kanserli olmak üzere toplam 109 hastaya ait tüm örneklerde, *ureA* gen bölgesine özgül 246 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant oluşumu saptanmış ve *H. pylori* varlığı PCR ile de doğrulanmıştır.

Çalışmaya alınan olguların %58 (63/109)'ünde *iceA1*, %24 (26/109)'ünde ise *iceA2* genotipi saptanmış, genotiplerin hastalara göre dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir. İstatistiksel analizde, kronik gastrit ve gastrik kanserli olgularda saptanan *iceA1* ve *iceA2* pozitiflik oranları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo I).

Histopatolojik incelemede "az", "orta" ve "çok" olmak üzere skorlanan *H. pylori* yoğunluğu dikkate alınarak yapılan değerlendirmede, hastaların klinik tanıları ile *H. pylori* yoğunluğu arasında bir ilişki belirlenmemiş; *H. pylori* yoğunluğu ile hasta gruplarında saptanan *iceA1* ve *iceA2* pozitifliği arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo I).

TARTIŞMA

H. pylori için tanımlanan *iceA1* gen ürününün, ilerlemiş gastrik enflamasyon ve duodenal ülser ile ilişkili olabileceğini düşündüren sonuçların alınmış olmasına rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalar, *iceA*'nın, klinik yansımaları ve virülans özellikleri ile ilgili ilişkisini desteklemekten ziyade coğrafi farklılıkları yansıttığını vurgulamaktadır⁵⁻¹³. Bazı araştırmacılar^{5-7,14-16}, *iceA* alellerinin peptik ülser gelişimi ile ilişkili olduğu yönünde veri elde ederken, bazıları^{8-12,17} da böyle bir ilişkinin olmadığını rapor etmektedirler.

Tablo I. Hasta Gruplarında *iceA1* ve *iceA2* Genotiplerinin Dağılımı ve Histopatolojik *H. pylori* Skorları

	Hasta grubu				
<i>H.pylori</i>	Kronik gastrit (n= 55)	Gastrik kanser (n= 54)	Toplam (n= 109)	p*	r**
<i>iceA1</i> pozitif, sayı (%)	28 (51)	35 (65)	63 (58)	0.14	0.141
<i>iceA2</i> pozitif, sayı (%)	11 (20)	15 (28)	26 (24)	0.34	0.091
Histopatolojik skor					
Az yoğun, sayı (%)	13 (24)	11 (20)	24 (22)	0.415	0.023
Orta yoğun, sayı (%)	22 (40)	25 (46)	47 (43)		
Çok yoğun, sayı (%)	20 (36)	18 (34)	38 (35)		
* Pearson ki-kare testi.					
** Pearson korelasyon katsayısı.					

Ülkemizde henüz yeni bir araştırma konusu olması nedeniyle *iceA* pozitif *H.pylori* suşları ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Erzin ve arkadaşları¹⁸, çalışmalarına dahil ettikleri suşların en az bir *iceA* genotipi taşıdıklarını bildirmişler; *iceA1* genotipini %74.7 (68/91), *iceA2* genotipini ise %25.3 (23/91) oranında saptadıklarını rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, gastrik kanserli olgulardan izole edilen suşlarda *iceA1* genotipinin baskın olduğunu da vurgulamışlardır¹⁸. Caner ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında da, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile kronik gastritli hastaların %66.6'sında *iceA2* (20/30; %66.6) pozitifliği saptanırken, duodenal ülserli hastalarda *iceA1* (11/16; %68.8) genotipinin daha baskın olduğu izlenmiştir. Bağlan ve arkadaşları¹⁹, 65 dispepsi ve 22 duodenal ülserli hastada yaptıkları çalışmada, 28 (%32.2) suшта *iceA1*, 12 (%13.8) suшта *iceA2* ve 22 (%25.3) suшта her iki genotipin de pozitif olduğunu bildirmişler, ancak *iceA* genotipleri ile hastalığın kliniği arasında ilişki olmadığını belirtmişlerdir.

Dünyanın çeşitli bölgelerinden yapılan çalışmalarda, *iceA1* ve *iceA2* prevalansının popülasyonlara göre farklı oranlarda tespit edildiği bildirilmekte, ancak yine de birçok çalışmada *iceA1* genotipinin baskın olduğu ifade edilmektedir^{6,9-20}. Bizim çalışmamızda da *iceA1* genotipi daha yüksek oranda bulunmuş; gastrik kanserli olguların %65'inde, kronik gastritli olguların ise %51'inde tespit edilmiştir (Tablo I). Buna karşın kronik gastrit ve gastrik kanserli hastalar arasında *iceA1* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış ve *iceA1* varlığı ile hastalık tablosu arasında bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda, *iceA2* genotipinin prevalansı ise gastrik kanserli hastalarda %28, kronik gastritli hastalarda %20 olarak belirlenmiş olup; benzer şekilde hasta grupları arasında *iceA2* pozitifliği açısından istatistiksel olarak önemli bir fark izlenmemiş ve *iceA2* varlığı ile hastalık tablosu arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Çalışmamıza dahil edilen hasta örnekleri, histopatolojik olarak *H.pylori*'nin saptandığı ve bakteri yoğunluğuna göre skorlamanın yapıldığı örneklerdir. Ancak histopatolojik olarak belirlenen *H.pylori* yoğunluğunun, kronik gastrit veya gastrik kanser kliniği ile korelasyon göstermediği izlenmiştir (Tablo I). Nitekim Çelebi ve arkadaşları²¹ da, kronik aktif gastrit ve duodenal ülser tanısı alan hastalarda MALT skoru ile *H.pylori* yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlar ve etkin olan mekanizmanın bakteri yoğunluğundan ziyade immünolojik uyarı olduğu yorumunu yapmışlardır.

Sonuç olarak bu çalışmada, hastanemize başvuran kronik gastrit ve gastrik kanserli hastaların doku örneklerinde *H.pylori iceA1* genotipi baskın (%58) bulunmuş, *iceA2* genotipi ise literatürdeki verilere benzer olarak daha düşük oranda (%24) saptanmıştır. Çalışmamızda elde edilen veriler, *iceA* geninin, *H.pylori* için klinik tablo ve virülans özelliklerinden ziyade coğrafik farklılıkları yansıtmakta olduğu fikrini desteklemektedir. Dolayısıyla, konunun aydınlatılması amacıyla çok merkezli ve geniş kapsamlı araştırmaların planlanmasının önemli olduğu, çalışmamızda elde edilen verilerin ilerideki çalışmalar için yol gösterici olacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Cirak MY, Akyon Y, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2007; 12(Suppl 1): S4-9.
2. Francis M, Philippe L. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(2): 280-322.
3. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22(2): 283-97.
4. Altındış M, Özdemir M. *H. pylori* ve tanısı. *Kocatepe Tıp Derg* 2003; 2(1): 1-12.
5. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110(6): 531-44.
6. van Doorn LJ, Figueriredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1998; 115(1): 58-66.
7. Figueiredo C, Quint WG, Sanna R, et al. Genetic organization and heterogeneity of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*. *Gene* 2000; 246(1-2): 59-68.
8. Graham DY, Yamaoka Y. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter* 2000; 5(Suppl 1): S3-9.
9. Smith SI, Kirsch C, Oyedeki KS, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *Med Microbiol* 2002; 51(10): 851-4.
10. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2274-9.
11. Kidd M, Peek RM, Lastovica AJ, Israel DA, Kummer AF, Louw JA. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. *Gut* 2001; 49(5): 629-35.
12. Wong BC, Yin Y, Berg DE, et al. Distribution of distinct *vacA*, *cagA* and *iceA* alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. *Helicobacter* 2001; 6(4): 317-24.
13. Benenson S, Halle D, Rudensky B, et al. *Helicobacter pylori* genotypes in Israeli children: the significance of geography. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35(5): 680-4.
14. Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, et al. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001; 39(5): 1746-50.
15. Momenah AM, Tayeb MT. *Helicobacter pylori cagA* and *iceA* genotypes status and risk of peptic ulcer in Saudi patients. *Saudi Med J* 2007; 28(3): 382-5.
16. Wu CC, Chou PY, Hu CT, et al. Clinical relevance of the *vacA*, *iceA*, *cagA*, and *flaA* genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43(6): 2913-5.
17. Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Sequence analysis and clinical significance of the *iceA* gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 483-8.
18. Erzın Y, Koksall V, Altun S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006; 11(6): 574-80.
19. Baglan PH, Bozdayı G, Ozkan M, Ahmed K, Bozdayı AM, Ozden A. Clarithromycin resistance prevalence and *iceA* gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *J Microbiol* 2006; 44(4): 409-16.
20. Caner V, Yılmaz M, Yonetcı N, et al. *H. pylori iceA* alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007; 13(18): 2581-5.
21. Çelebi A, Alicanoğlu R, Keskin S ve ark. *Helicobacter pylori* pozitif kronik aktif gastrit ve duodenal ülserli hastalarda MALT prevalansı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2005; 25(5): 627-35.