Patoloji Bülteni 2000; 17(2): 76-79
Turkish Bulletin of Pathology 2000; 17(2) 76-79

"Helicobacter Pylori" İnfeksiyonunun Gastrik Mukozal Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Effect of Helicobacter Pylori Infection on Gastric Mucosal Cell Proliferation

Çiğdem Irkkan [1], Fatma Aktepe [2], Işın Pak [1]
[1] *S.B. Ankara Onkoloji Hastanesi Patoloji Bölümü, Ankara*
[2] *S.B. Aydın Doğumevi Patoloji Bölümü, Aydın*

Son yıllarda gastrik karsinom gelişmesinde etken mekanizma olarak gastrik mukozal proliferasyon bozuklukları üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada gastrik karsinom gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen Helicobacter pylori'nin gastrik mukozal proliferatif aktivite üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kırkaltı adet "Helicobacter pylori" pozitif gastrit, 33 adet "Helicobacter pylori" negatif gastrit ve 8 adet normal mide mukozası tanısı alan endoskopik biyopsi materyali çalışma grubu olarak seçilmiştir. Proliferatif aktiviteyi belirlemek için materyallere Ki-67 (MIB1) ile immünohistokimyasal boyama uygulanmıştır. "Helicobacter pylori" pozitif ve "Helicobacter pylori" negatif gastritli mideler proliferatif aktiviteleri yönünde karşılaştırılmıştır.

Proliferasyonun "Helicobacter pylori" pozitif gastritlerde Helicobacter pylori negatif gastritler ve kontrol gruba göre daha yüksek olduğunu görülmüştür. Bu artışta hem "Helicobacter pylori" varlığının hem de oluşturduğu aktivasyonun etkili olduğu görülmüştür. Gastrik karsinogenezde rol oynadığı düşünülen mukozal proliferasyon artışının "Helicobacter pylori" pozitif gastritlerde görülmesi, "Helicobacter pylori'nin gastrik kanser gelişmesinde etkili faktör olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Gastrit, Helicobacter pylori, hücre proliferasyonu, Ki-67.

Gastric mucosal cell proliferation is blamed to be a mechanism in the gastric carcinogenesis. Helicobacter pylori is found to be associated with gastric carcinoma and thought to be a factor in the pathogenesis. Aim of this study was to search the effect of Helicobacter pylori on the gastric bucosal cell proliferation.

Forty-six Helicobacter pylori positive gastritis, 33 Helicobacter pylori negative gastritis and 8 normal gastric mucosal endoscopic biopsy material were included in this study. To determine the proliferative activity, Ki-67 (MIB1) immunohistochemical staining was performed.

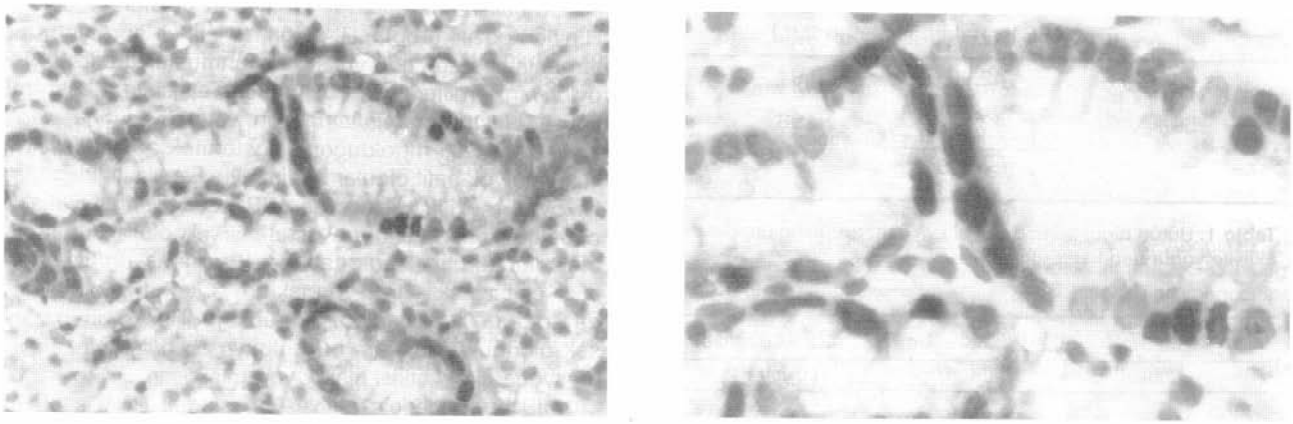
Proliferative activity in Helicobacter pylori positive group was found to be higher than Helicobacter pylori negative and control groups, and the increased proliferative activity was seemed to be associated with both the presence of Helicobacter pylori and the induced activation. In conclusion, Helicobacter pylori induced increase in proliferative activity may be a major factor in gastric carcinogenesis.

Key Words: Gastritis, Helicobacter pylori, cell proliferation, Ki-67.

Ankara Onkoloji Hastanesi Patoloji Laboratuvarında 1994 ile 1996 tarihleri arasında kayıtlı 46 adet H.pylori pozitif gastrit, 33 adet H.pylori negatif gastrit ve 8 adet normal mide mukozası olmak üzere toplam 87 olguya ait mide endoskopik biyopsi materyali seçilmiştir. Çalışma grubunun seçiminde olguların daha önce benign veya malign sebeple gastrektomi geçirmemiş olmalarına, biyopsi materyallerinin malign odak veya süphesi taşımıyor olmalarına ve daha öence H.pylori gastriti saptanarak H. pylori'ye tedavi almamış olmalarına dikkat edilmiştir. Ayrıca en az iki antral örnekleme yapılmış ve yüzey epitelinden antral glandlara kadar foveola bütünlüğü izlenebilen oryantasyona sahip materyaller çalışma koşullarına uygun kabul edilmiştir.

Sydney sistemi [19] içerisinde tarif edilen kriteler dikkate alınarak olgular kronik gastrit ve normal mide mukozası olarak sınıflandırılmıştır. Sydney sistemi içerisinde lamina propria, foveola veya yüzey epitelindeki nötrofil infiltrasyonu olarak tarif edilen inflamasyon, %30 lar kuralı esas alınarak derecelendirilmiştir. Kronik gastrit gösteren olgular. modifiye Giemsa boyanmış preperatlarda H. pylori içerip içermemelerine göre ikiye ayrılmıştır. İmmünhistokimyasal boyama öncesi doku kesitlerinde antijenlerin tekrar kazanılması amacıyla mikrodalga fırında (650 watt) 30 dakika kaynatma süresi uygulanmıştır. Alkalen fosfataz anti-alkalen fostafaz yöntemi [20] kullanılarak, kullanıma hazır MIB1 antikoru (Biogenex, USA) uygulanmıştır. Kromojen olarak New Fuchsin (Biogenex, USA) kullanılmıştır.

Boyama sonuçlarının değerlendirilmesi intestinal



Resim 1a-b: MIB 1 boyalı preparatlarda değerlendirilmenin yapıldığı kriptlerin boyun bölgesi (a: x200, b: x400).

metaplazi içermeyen, doğru oryante kesitlerde, kriptlerin boyun bölgesindeki ardışık hücrelerde yapılmıştır (resim 1).

Değerlendirme kör olarak ve olgulardan 20 tanesinde de iki gözlemci tarafından yapılmıştır. MIB1 boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde, soluk veya kuvvetli boyanan tüm hücreler pozitif değerlendirilmiştir. Değerlendirmede en büyük büyütme (x400) kullanılarak, kriptlerde 500 ardışık hücre sayılmıştır. Her olgu için MIB1 değeri, MIB1 pozitif hücrelerin yüzdesi hesaplanarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar; bağımsız grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında t test; gruplar arası farklılıkların karşılaştırılmasında "Chi-Square" testi, ikiden fazla grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında "one way analysis of variance", gözlemciler arası güvenilirlik ve iki proliferasyon belirleyici yöntemin uyumunun araştırılmasında korelasyon testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grupta yapılan karşılaştırılmalarda Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Yaş ortalaması H. pylori pozitif grupta 46.55 (17-75), H.pylori negatif grupta 53.5 (19-81) ve kontrol grupta 51.2(24-83) olarak saptanmıştır. H. pylori pozitif ve negatif gruplar arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Yaş faktörünün proliferasyon üzerinde etkisini görmek amacıyla bütün olgular içerisinde, 50 yaş altı ve üstü gruplar arasında MIB 1 değeri ortalamaları karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$, tablo 1).

Proliferasyon belirleyici yöntemin sonuçlarının değerlendirilmesinde gözlemciler arası uyum araştırıldığında, iki gözlemci arasında korelasyon katsayısı 0.053 olan bir uyum bulunduğu ve bu uyumun anlamlı olduğu görülmüştür ($r=0.528$, $p<0.05$).

Çalışma gruplarında proliferatif değerlere bakıldığında, normal grupta düşük, H. pylori negatif grupta daha yüksek, H. pylori pozitif grupta en yüksek olduğu görülmüştür. H. pylori pozitif grupta MIB1 değerleri hem H. pylori negatif, hem de normal gruptan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (tablo 2). H pylori pozitif grupta, proliferasyon, orta-şiddetli aktivasyonu olan olgularda, aktivasyonu yok-hafif olan olgulardakinden yüksek bulunmuş, bu farkın anlamlı olduğu saptanmıştır (tablo 3). İnflamasyon şiddetinin artmasıyla proliferasyon yükselme göstermiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (tablo 3). Aktivasyonu hafif olgularda H. pylori pozitif ve negatif gruplar karşılaştırıldığında, H. pylori pozitif grupta porliferatif aktivite daha yüksek bulunmutur, ancak bu fark anlamlı değildir ($p>0.05$, tablo 4).

TARTIŞMA

Uzun yıllar boyunca gastrik karsinom etyopatogenezinde etkili faktörler olarak diyet alışkanlıkları, çevre faktörleri ve genetik faktörler üzerinde durulmuştur [21]. Son yıllarda ise gastrik karsinom gelişmesinde etken mekanizma olarak üzerinde durulan gastrik mukozal proliferasyon bozukluklarında H. pylori'nin ve yarattığı inflamasyonun etkili olabileceği görüşleri vardır [8,9]. Bu çalışmada, gastrik mukozal proliferatif aktivite üzerine H. pylori'nin etkisi araştırılmıştır.

Proliferatif aktivite üzerinde sadece H. pylori'nin etkisini ortaya koyabilmek amacıyla çalışma materyalinin seçiminde proliferatif aktiviteyi etkilebilmek diğer faktörleri içermemelerine dikkat edilmiştir. Çünkü, karsinom çevresinde normal mukozada [13,14] ve gastrektomili midelerde [22] porliferatif aktivite artmış bulunmakta, H. pylori tedavisi sonrasında mukozada proliferatif aktivite düşmekte, ayrıca H. pylori saptanmasında yanlış değerlendirmeye yol açmaktadır [15,16]. Materyalin antral örnekler olması sağlanmıştır. Çünkü, H. pylori kolonizasyonu ve inflamasyon antrumda daha şiddetli bulunmakta [23,24], proliferatif aktivite fundus ve antrum mukozasında korelasyon göstermemektedir [25].

Olgular arasında uyumlu bir karşlaştırma elde etmek için mukozal proliferatif aktivite intestinal metaplazi ve displazi içermeyen alanlarda ve mukozal proliferasyonu en iyi temsil eden boyun bölgesinde değerlendirilmiştir. En az iki antral örnekleme yapıldığında, histolojik olarak

	n	MIB1 ortalaması	standart hata
Yaş<50	41	42.90	0.94
50+	46	43.35	0.98
		p>0.05	

Tablo 1: Bütün olgularda 50 yaş altı ve üstü grupların proliferatif aktivite yönünden karşılaştırılması.

MIB 1	(8) 37.15±2.04	(33) 42.13±1.14	46 44.89±0.82
	Normal	H.pylori-	H.pylori+
Normal			
H.pylori-	p>0.05		
H.pylori+	p<0.05	p<0.05	

(n) ortalama+ standart hata

Tablo 2 : Çalışma gruplarında MIB 1 Ortalamalarının karşılaştırılması

	n	MIB1 ortalamaları	p değeri
Aktivasyon			
Yok-hafif	(36)	43.47	
Orta-şiddetli	(10)	50.03	p<0.01
İnflamasyon			
hafif	(14)	43.47	
orta	(25)	44.95	
şiddetli	(7)	46.83	p>0.05

Tablo 3: H. pylori pozitif grupta histopatolojik parametrelerin proliferatif aktivite üzerine etkisi.

	(n)	MIB1 ortalamaları + standart hata	p değeri
Aktivasyon (yok hafif)			
Hp +	(36)	43.47±0.85	
Hp -	(33)	42.14±1.14	>0.05

Tablo 4 : Gruplarda proliferatif aktivitenin aktivasyonu yok-hafif olgularda karşılaştırılması.

H. pylori saptanmasında örnekleme hatasının minimum olduğu bildirilmektedir [26,27].

Oluşturulan H. pylori pozitif ve negatif gruplar arasında yaş ortalaması anlamlı fark göstermiştir. Ancak, bütün hastalar arasında 50 yaş altı ve üstü olgular proliferatif aktivite yönünden karşılaştırıldığında MIB1 değerlerinin iki grupta farklı olmadığı görülmüştür. Yani, yaş ortalamaları farklı olan bu çalışma gruplarında yaşın, proliferatif aktiviteyi etkilemediği dikkati çekmiştir. Chow ve ark [16] da çalışmalarında 50 yaş altı ve üstü hastaları proliferatif aktivite yönünden karşılaştırmışlar ve yaşın proliferatif aktivite üzerine etkili olmadığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada MIB1 ile belirlenen proliferatif aktivite H.pylori pozitif grupta, H. pylori negatif ve normal gruptan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (tablo 2). H. pylori'nin proliferasyon üzerindeki etkisinin direkt mi yoksa oluşturduğu inflamasyon ve aktivasyona bağlı indirekt bir etki mi olduğunu göstermek amacı ile aktivasyonu yok-hafif olgular birbirleriyle karşılaştırıldığında, H. pylori pozitif gastritlerde MIB1 değerlerinin yüksek olmakla birlikte bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir (tablo 4). Proliferasyon üzerinde etkili olabilecek aktivasyon faktörü ortadan kaldırıldığında Correa [16], H.pylori pozitif grupta proliferasyonun yüksek olduğunu bulmuş, bu bulguyu H. pylori'nin proliferasyona direkt etkisi olarak yorumlamıştır.

MIB1 değerlerinin aktivasyon şiddeti ile yükseldiği görülmüştür (tablo 3). Correa [16]'nın çalışmasında da gösterilen bu ilişki, proliferasyon üzerinde H. pylori'nin etkisinin yalnızca direkt olmayıp, lökositler üzerinden indirekt bir etkiye de sahip olabileceğine yönelik şüpheleri artırmaktadır.

Chow ve ark [18] ise. BrdU antikoru kullanarak, H. pylori gastritinde proliferasyonun H. pylori'siz gastritlerden farklı olmadığını bulmuşlardır. Ancak H. pylori saptanmasında diğer çalışmalarda ve bizim çalışmamızda kullanılan yöntemden farklı olarak üreaz testini kullandıkları görülmektedir. H. pylori saptanmasında üreaz testinin histolojik Giemsa yöntemine göre daha az sensitif olduğu bildirilmektedir [28]. Bu nedenle Chow ve ark (18)'nın H. pylori'li materyalleri yanlış olarak H. pylori'siz grupta incelemiş olmaları söz konusu olabilir

Sonuç olarak, H. pylori negatif gastritlerde görülmeyen bir proliferasyon artışı H. pylori gastritlerinde görülmektedir. Bu artışa H. pylori'nin yanısıra yarattığı aktivasyonun da neden olduğu anlaşılmaktadır. Toplumlarda oldukça sık rastlanan H. pylori gastritlerinin, gastrik kanser etyopatogenezinde bir faktör olabileceğinin gösterilmesi, H. pylori gastritli her olgunun tedavi edilmesi yönündeki görüşleri desteklemekte, ancak tedavi maliyeti ve komplikasyonları da gözardı edilememektedir. Gastrik karsinogenezde bir faktör olarak H. pylori'nin etki mekanizmalarını araştıracak yeni çalışmalar, tedavi konusundaki tavırların belirlenmesini ve böylece H. pylori eradikasyonu ile belki de karsinogenezdeki bir basamağın önlenmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Warren JR. Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983;i;1273-1275.
2. Buck GE, Gourley WK, Subramanyam K, Latimer JM. Relation of Campylobacter pylorides to gastritis and peptic ulcer. J Infect Dis 1986; 153. 664-669.
3. Price AB, Levi J, dolby JM, Duncombe PL, Simth A. Campylobacter pyloridis in peptic ulcer disease: microbiology, pathology, and scannig electron microscopy. Gut 1985;26:1183-1187.
4. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yardnell JWG, Stacey Ar, Wald N, et al.Association between infection with Helicobacter pylori and gastric cancer: Evidence from a prospective inves-

tigation. Br Med J 1991;302: 1302-1305.
5. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersten DP, Chan Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Eng J Med 1991;325 (16): 1127-1131.
6. Buruk F, Berberoğlu U, Aksaz E, Pak I, Çelen O. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. Br J Surg 1993;80:378-379.
7. Eurogast Study Group. An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. Lancet 1993;341:1359-62.
8. Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22 (1):89-104.
9. Correa P. Heciobacter pylori and gastric carcinogenesis. Am j Surg Pathol 1995;19 Suppl 1: S37-S43.
10. Cohen SM, Purtilo DT, Ellwein LB. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis. Mod Pathol 1991;4(3): 371-382.
11. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA; Henderson BE, Increased cell division as a cause of human cancer. Cancer Res 1990;50:7415-7421.
12. Deinlein E, Schmidt H, Reimann JF, GraBel-Pietrusky R, Hornstein OP. DNA flow cytometric measurement in inflammatory and malignant human gastric lesions. Vichows Arch A Path Anat 1983;402:185-193.
13. Filipe MI, Mendes R, Lane DP, Morris IW. Accessment of porliferating cell nuclear antigen expression in precursor stages of gastric carcinoma using the PC10 antibody to PCNA. Histopathol 1993;22:349-354.
14. Rosa J. Metha A, Filipe MI. Nucleolar organiser regions in gastric carcinoma and its precursor stages. Histopathol 1990;16:265-269.
15. Brenes F, Ruiz B, Correa P, Hunter F, Rhamakrishnan T, Fontham e, et al. Helicobacter pylori causes hyperproliferation of the gastric epithelium: Pre-and post-eradication indices of proliferting cell nuclear antigen. Am J Gastroenterol 1993;88 (11): 1870-1875.
16. Correa P, Ruiz B, Shi T, Janney A, Sobhan M, Torrado j, et al. Helicobacter pylori and nucleolar organiser regions in the gastric antral mucosa. Am J Clin Pathol 1994;101:656-660.
17. Havard TJ, Sarsfield P, Wotherspoon AC, Steer HW. Increased gastric epithelial cell proliferation in Helicobacter pylori associated follicular gastritis. J Clin Pathol 1996;49: 68-71.
18. Chow KW, Bank S, Ahn J, Roberts J, Blumstein M, Kanz V, Helicobacter pylori infection does not increase gastric antrum mucosal cell proliferation. Am J Gastroenterol 1995;90(1):64-66.
19. Price A. The Sydney System:Histological division. J Gastroenterol Hepatol 1991;6:209-222.
20. Cordell JL, Palini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem 1994;32:219-29.
21. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res 1988;48: 3554-3560.
22. Offerhaus GJA, Stadt J Van de, Samson G, Tytgat GNJ. Cell proliferation kinetics in the gastric remnant. Eur J Cancer Clin Oncol 1985;21:73-79.
23. Strauss RM, Wang TC, Kelsey PB, Compton CC, Ferraro MJ. Association of Helicobacter pylori infection with dyspeptic symptoms in patient undergoing gastroduodenoscopy. Am J Med 1990;89:464-469.
24. Stolte M, Eidt S, Ohnsmann A. Differences in Helicobacter pylori associated gastritis in the antrum and body of the stomach. J Gastroenterol 1990;28:229-233.
25. Hansen OH, Pedersen T, Larsen JK. A method to study cell proliferation kinetics in human gastric mucosa. Gut 1975;16:23-27.
26. Genta RM, Graham DY. Comparison of biopsy sites forthe histopathologic diagnosis of Helicobacter pylori: A topographic study of Helicobacter pylori: A topographic study of H. pylori density and distribution. Gastrointes Endosc 1994;40:342-345.
27. Wyatt JI, Primrose J, Dixon MF. Distribution of Campylobacter pylori in gastric biopsies. J Pathol 1988;155: 350A (abs).
28. Bujanover Y, Konikoff F, Baratz M. Nodular gastritis and Helicobacter pylori. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990;11: 41-44.