

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ ÜNİTESİ

GASTROÖZEFAGEAL REFLÜ HASTALIĞINDA MEDİKAL TEDAVİNİN
ÖZEFAGUS SIKI BAĞLANTI PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Musa AYDINLI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2007

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ ÜNİTESİ

GASTROÖZEFAGEAL REFLÜ HASTALIĞINDA MEDİKAL TEDAVİNİN
ÖZEFAGUS SIKI BAĞLANTI PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Musa AYDINLI

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bülent SİVRİ

ANKARA
2007

TEŞEKKÜR

Tezimin her aŐamasında, benden yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof.Dr. Bülent Sivri' ye, destekleri için Dr. Osman Ersoy, Dr. Özgür Harmancı, Dr. Özlem Yöner ve Dr. İbrahim K. Önal ile tüm Gastroenteroloji hemŐire ve teknisyen ekibine; histopatolojik incelemeleri titizlikle tamamlayan Dr. Elif Güzel ile Prof. Dr. Atilla Dağdeviren' e teŐekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Aydinli M., Gastroözefageal Reflü Hastalığında Medikal Tedavinin Özefagus Sıkı Bağlantı Proteinleri Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Tezi. Ankara, 2007. Gastroözofageal Reflü Hastalığı (GÖRH)' nin patogenezinde özefagus epitelindeki azalmış doku direnci önemli bir faktördür. Sıkı bağlantı proteinleri, esas olarak da kladinler, epitelyal doku direncinin temel yapısal bileşenleridir. Reflü özefajiti (RE) ve Barrett metaplazisi (BM)' nde kladinlerin ekspresyonlarında değişiklik ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda, RE ve eroziv olmayan reflü hastalığı (NERD) gruplarında, medikal tedavinin kladinlerin ekspresyonu üzerindeki etkisinin, karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı. Önceden tedavi almamış onüç hasta (9 kadın, 4 erkek, ortalama yaş 34 (22-46)), semptom skorlaması ve 24-saatlik pH-metre ile GÖRH tanısı konulduktan sonra çalışmaya alındı. Başlangıçta ve tedavi sonrasında üst endoskopi ile değerlendirme yapılarak distal özefagustan biyopsiler alındı. Ayrıca ilk işlemde hızlı üreaz testi (CLO testi) için antrum ve korpustan biyopsiler alındı. Endoskopik bulgulara göre RE ve NERD grupları belirlendi. Tüm hastalara 6 haftalık proton pompa inhibitörü tedavisi (PPI, 2x40 mg/gün) ve H.pylori gastriti olan hastalara 14 günlük üçlü eradikasyon tedavisi (klaritromisin 2x500 mg/gün, amoksisilin 2x1 gr/gün, PPI 2x40 mg/gün) uygulandı. Kladin-1 ve 2 ekspresyonu immünofloresan ve immünonoperoksidaz teknikleriyle çalışıldı. Altı hastada RE, yedi hastada NERD saptandı. RE grubundaki bir hastada BM saptandı. H.pylori gastriti NERD grubunda 3 hastada, RE grubunda 5 hastada saptandı. RE grubunda, NERD grubuna kıyasla kladin-1 ekspresyonu daha belirgin olarak saptandı. Tedavi sonrası RE grubunda kladin-1 ekspresyonu hafifçe azalırken, NERD grubunda değişiklik saptanmadı. Özofagus yüzey epitelinde kladin-2 ekspresyonu her iki grupta tespit edilmedi. Kladin ekspresyonu ile GÖRH' de ortaya çıkan özefagus epitelindeki intersellüler aralıklardaki dilatasyon arasında nedensel bir ilişkili olabilir. Kladin-1 ekspresyonundaki artış intersellüler aralıklarda daha fazla dilatasyona yol açarak ve asite bağlı zedelenmeyi kolaylaştırarak RE patogenezinde rol alıyor olabilir.

Anahtar kelimeler: Kladin, sıkı bağlantılar, gastroözofageal reflü

ABSTRACT

Aydinli M., The Effect of Medical Treatment on Expression of Tight-Junction Proteins in Gastroesophageal Reflux Disease. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Gastroenterology. Ankara, 2007. Impaired tissue resistance is an important factor in pathogenesis of Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). Tight-junctions mainly the claudins are the basic structural components of epithelial tissue resistance. The expression of claudins was altered in reflux esophagitis (RE) and Barrett metaplasia (BM). We aimed to investigate the effect of medical treatment on the expression of claudins in the groups of RE and non-erosive reflux disease (NERD) with comparison. 13 never treated patients (9 female, 4 male, median age 34 (22-46)) diagnosed as GERD with a scoring system and 24-hour pH monitoring were enrolled to the study. Endoscopy was performed at the baseline and after treatment and biopsies were taken from distal esophagus on both occasions. Biopsies from the antrum and corpus were also obtained for rapid urease test (CLO-test) in the first procedure. Based on endoscopic findings erosive and non-erosive groups were defined. All patients were treated with proton pump inhibitors (PPI, 2x40 mg/day) six weeks and triple therapy (claritromycin 2x500 mg/day, amoxicillin 2x1 gr/day, PPI 2x40 mg/day) for 14 days for H.pylori gastritis. The expression of Claudin-1 and 2 were determined by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. RE was diagnosed in six and NERD was diagnosed in seven the patients. BM was diagnosed in one patients in RE group. H.pylori gastritis was diagnosed in 3 patients in RE group and 5 patients in the NERD group. In RE group claudin-1 expression was significantly increased compared to NERD. The expression of claudin-1 was slightly decreased after the treatment in RE group but there was no difference in the NERD group. The expression of claudin-2 was absent in surface epithelium of esophagus in both groups. The expression of claudin-1 may be causatively associated with dilated intercellular spaces in GERD. The increased expression of claudin-1 may play role in pathogenesis of RE by causing more dilation of intercellular spaces and facilitating the acid related damage of epithelium.

Key words: Claudin, tight junctions, gastroesophageal reflux

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	(iv)
ÖZET	(v)
ABSTRACT	(vi)
İÇİNDEKİLER	(vii)
SİMGE VE KISALTMALAR	(ix)
TABLolar	(x)
RESİMLER	(xi)
1- GİRİŞ VE AMAÇ	(1)
2. GENEL BİLGİLER	(3)
2.1. Gastroözofageal Reflü hastalığı tanımı	(3)
2.2. Klinik	(4)
2.3. Tedavi	(4)
2.3.1. Yaşam Tarzı Değişiklikleri ve Diyet	(4)
2.3.2. Asit-Baskılayıcı Tedaviler	(5)
2.3.3. İdame Tedavisi	(5)
2.4. Tanı	(6)
2.4.1. Özofagoskopi	(6)
2.4.2. pH-metre	(6)
2.4.3. Özofagiyal Manometri	(7)
2.4.4. Özofagografi	(7)
2.4.5. Histopatoloji	(7)
2.4.6. Antisekretuar Tedaviye Yanıt (PPI testi)	(7)
2.5. Patofizyoloji	(8)
2.5.1. Saldırgan faktörler	(8)
2.5.2. Savunma faktörleri	(8)
2.5.2.1. Antireflü bariyeri	(9)
2.5.2.2. Lüminal asit klerensi	(10)
2.5.2.3. Doku Direnci	(11)
2.5.2.4. Sıkı Bağlantılar	(12)
3. MATERYAL METOD	(14)
3.1. Hasta grubu	(14)
3.2. Etik Kurul Onayı	(14)

3.3. Hasta değerlendirme formu	(14)
3.4. pH-metre	(18)
3.5. Endoskopi	(19)
3.6. Tedavi	(19)
3.7. Histopatolojik İnceleme	(19)
3.7.1. Örneklerin Hazırlanması	(19)
3.7.2. Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması	(20)
3.7.3. Antikorlar	(21)
3.7.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama	(23)
3.7.5. İndirekt İmmünofloresan Boyama	(24)
4. SONUÇLAR	(25)
4.1. Hasta grupları	(25)
4.2. Endoskopik inceleme	(25)
4.3. Hızlı üreaz testi	(26)
4.4. pH-metre	(27)
4.5. Histopatolojik inceleme	(28)
4.6. İmmunohistokimyasal bulgular	(30)
4.6.1. Reflü özofajit tedavi öncesi	(31)
4.6.2. Reflü özofajit tedavi sonrası	(34)
4.6.3. Eroziyon olmayan Reflü hastalığı grubu tedavi öncesi	(37)
4.6.4. Eroziyon olmayan reflü hastalığı, tedavi sonrası	(41)
5- TARTIŞMA	(45)
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	(50)
KAYNAKLAR	(51)

SİMGELER VE KISALTMALAR

GÖRH:Gastro özofagiyal reflü hastalığı

GERD: Gastroesophageal reflux disease

HP: *Helicobacter pylori*

RE: Reflü özefajit (reflux esophagitis)

NERD: Eroziv olmayan reflü hastalığı (*Non-erosive reflux disease*)

AÖS: Alt özofagus sfinkteri

GAÖSG: Geçici alt özofagus sfinkter gevşemeleri

PPİ: Proton pompası inhibitörü

H2RB: Histamin-2 reseptör blokörleri

TABLolar

TABLO	SAYFA
Tablo-1: Kullanılan primer antikorların özgüllüğü, klon adı ve kaynağı	21
Tablo-2: Hastaların demografik özellikleri	25
Tablo-3: Hastaların gruplara göre endoskopi sonuçları	26
Tablo-4: Gruplara göre hızlı üreaz testi sonuçları	26
Tablo-5: Gruplara göre pHmetre sonuçları	27
Tablo-6: Eroziv GÖRH grubunda özofagus epitelindeki klauđin-1 ekspresyonu	43
Tablo-7: Eroziv GÖRH grubunda tedavi sonrası özofagus epitelindeki klauđin-1 ekspresyonu	43
Tablo-8: Eroziv olmayan GÖRH' de özofagus epitelindeki klauđin-1 ekspresyonu	44
Tablo-9: Eroziv olmayan GÖRH' de tedavi sonrası özofagus epitelindeki klauđin-1 ekspresyonu	44

RESİMLER

RESİM	AÇIKLAMA	SAYFA
Resim-1		28
Resim-2		29
Resim-3		29
Resim-4		30
Resim-5		32
Resim-6		32
Resim-7		33
Resim-8		33
Resim-9	Distal özofagustan alınan endoskopik biyosilerden hazırlanmış olan preparatların, immünofloresan boyama ile ışık mikroskopundaki görünümleri	34
Resim-10		35
Resim-11		35
Resim-12		36
Resim-13		36
Resim-14		37
Resim-15		38
Resim-16		39
Resim-17		39
Resim-18		40
Resim-19		40
Resim-20	41	
Resim-21	42	

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Gastroözofageal Reflü hastalığı (GÖRH), toplumda çok yaygın olarak görülen bir hastalıktır. GÖRH her yaşta görülebilir. Hastalık sıklıkla pirozis ve regürjitasyon şeklinde kendini belli eder. Tipik yakınmalarla gelen hastalarda tanı konulması güç değildir; ancak tanı için ileri testlerin yapılması da gerekli olabilir. GÖRH, endoskopik olarak saptanabilen özofagus zedelenmesiyle (Reflü özofajit, RE) birlikte olabileceği gibi, özofajit olmadan da tipik yakınmalarla ortaya çıkabilir (erozif olmayan Reflü hastalığı, NERD). GÖRH atipik yakınmalar olarak adlandırılan akciğer, üst solunum yolu, orta kulak veya diş sorunlarıyla da ortaya çıkabilir.

GÖRH tedavisinde diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri ile birlikte, medikal tedavi olarak proton pompa inhibitörleri (PPİ) önerilmektedir. PPİ tedavisinin hastalığın kontrolündeki etkisi kanıtlanmış olup, günümüzde hastalığın standart medikal tedavisini oluşturmaktadırlar. Ek olarak; güncel tedavi kılavuzlarında uzun süreli medikal tedavi uygulanacak hastalara, eğer *Helicobacter pylori* gastriti varsa, uzun süreli PPİ tedavisinden önce eradikasyon tedavisi de önerilmektedir.

Hastalığın patogenezinde anti-reflü mekanizma ve özofagusta lüminal asit klerensindeki bozukluklar rol oynamaktadır. Bazı hastalarda ise antiReflü mekanizmasının işlevi normal ve asit temizlenmesi yeterli olduğu halde GÖRH ortaya çıkabilmektedir. Bu hastalarda epitelyal doku direncinde azalma olduğu saptanmıştır. Doku direncinin en önemli bileşeni preepitelyal savunmadır ki bunu da temel olarak epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar oluşturur. Epitelyal sıkı bağlantılar hücrelerin polaritesinin korunması, adhezyonu ve bariyer işlevlerinin sürdürülmesi için önemli; ayrıca hayatın devamı için varlıkları zorunlu olan oluşumlardır. Sıkı bağlantıların hem yapısal hem de işlevsel olarak en önemli bileşenleri sıkı bağlantı proteinleridir. Bu sıkı bağlantı proteinleri arasında okludinler, klaudinler ve immunoglobulin süperailisine üye olan bazı proteinler yer almaktadır. Klaudinlerin özellikle malin epitelyal tümörlerle ilgili yapılan araştırmalarda displazi gelişimi, tümör oluşumu ve metastaz ile ilgileri saptanmıştır. Displazinin erken tanısı, metastazın önlenmesi ve kemoterapi için hedef alınmaları açısından da araştırmalar devam etmektedir. Bunun yanında neredeyse her organla ilgili benin hastalıkların patofizyolojisinde rolleri olduğu da saptanmıştır.

Özofagusun sıkı bağlantı proteinleriyle ilgili olarak çalışmalar, daha çok özofagus karsinomu üzerinde yapılmıştır. Birkaç çalışmada Barrett metaplazisi (BM)'

nde sıkı bağlantı proteinleri çalışılmıştır. Ratlarda yapılan bir çalışmada ise kronik RE ile ilişkisi olabileceği bildirilmiştir. GÖRH hastalarındaki sıkı bağlantı proteinlerini araştıran çalışma mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı GÖRH hastalığında, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonlarının RE ve NERD gruplarında karşılaştırmalı olarak değerlendirmek, uygulanacak standart 6 haftalık medikal tedaviyi (PPI) takiben ekspresyonlarında farklılık olup olmayacağını saptamaktır. Hastalarla yapılmış bir çalışma olmadığından, literatüre katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gastroözofageal Reflü hastalığı tanımı

2006 Montreal sınıflamasına göre GÖRH, mide içeriğinin özofagusa doğru reflüsü nedeniyle gelişen, sıkıntı verici yakınma ve/veya komplikasyonların görüldüğü klinik durumdur (1). Gastroezofagiyal reflü fizyolojik olarak olarak da oluşmakta olup GÖRH ile birbirinden kesin sınırlarla ayırmak güçtür. Ancak fizyolojik Reflü genellikle postprandial dönemde oluşur ve uykuda nadiren görülür, kısa süreli ve asemptomatiktirler. Patolojik Reflü atakları ise yakınmalara neden olur ve/veya mukozal zedelenme ya da komplikasyonlarla ilişkilidir. Fizyolojik Reflünün aksine uykuda da ortaya çıkarlar.

Montreal sınıflamasına göre GÖRH ve ilişkili sendromlar aşağıda sunulmuştur:

1) Özofageal sendromlar

a) Semptomatik sendromlar

- Tipik Reflü sendromu
- Reflü göğüs ağrısı sendromu

b) Özofagus zedelenmesiyle birlikte olan sendromlar

- Reflü özofajit
- Reflü darlığı
- Barrett özofagus
- Özofagus adenokarsinomu

2) Özofagus dışı sendromlar

a) İlişki kurulan sendromlar

- Reflü öksürük sendromu
- Reflü larinjit sendromu
- Reflü astma sendromu
- Reflü dental erozyon sendromu

b) İlişkisi ileri sürülen sendromlar

- Farinjit
- Sinüzit
- İdiyopatik pulmoner fibrozis
- Tekrarlayıcı otitis media

GÖRH' de izlenen özofagus hasarı endoskopik bulgular dikkate alınarak tanımlanır: Reflü (erozif) özofajit (RE) veya erozif olmayan (non-erozif Reflü) reflü hastalığı (NERD) (2).

2.2. Klinik

En sık görülen yakınmalar pirozis, regürjitasyon ve yutma güçlüğüdür. Montreal sınıflamasında sıralanmış olan özofagus-dışı sendromlara ilişkin farklı yakınmalar da GÖRH' de görülebilir.

Pirozis, retrosternal bölgede hissedilen rahatsız edici yanma hissidir, boyuna doğru yayılabilir ve sıklıkla yemek sonrası görülür. Regürjitasyon, çaba sarfetmeksizin, bulantı, öğürme veya karın kaslarında kasılma olmaksızın, asidik mide içeriği ve birlikte az miktarda gıdanın farinkse ulaşmasıdır. Yutma güçlüğü, uzun süren pirozis varlığında, reflü özofajit olan hastalarda görülebilir, proton pompa inhibitörleri (PPI) ne iyi yanıt verir. Odinofaji nadiren görülür, eğer varsa özofagus ülserlerinin varlığını düşündürür. GÖRH ile ilişkili göğüs ağrısı anjina pektoris taklit edebilir. Bulantı nadiren GÖRH ile ilişkili olup varsa diğer nedenlerin de araştırılması gereklidir.

2.3. Tedavi

Hafif GÖRH, empirik olarak yaşam tarzı değişiklikleri ve diyet önerileri ile antiasitler, Histamin-2 reseptör blokörleri (H2RB) ile tedavi edilebilirken daha ağır seyirli hastalığın tedavisi, uzun süreli PPI kullanımı ve bazen de endoskopik tedaviler veya antireflü cerrahisiyi gerekli kılabilir. Bu iki kutup arasında tedavi, iki farklı yaklaşımla uygulanabilir: yaşam tarzı değişiklikleri ve diyet önerileri ile başlanarak, yakınmalar kontrol altına alınana kadar giderek artan kuvvette ilaç tedavisinin düzenlenmesi yani 'artan basamak tedavisi' diğeri ise yoğun antisekteruar tedavi ile başlayıp yakınmaların kontrol altına alınmasını takiben, yakınmalar ortaya çıkana kadar tedavi azaltılarak idame tedavinin belirlenmesi yani 'azalan basamak tedavisi'.

2.3.1. Yaşam Tarzı Değişiklikleri ve Diyet

Yakınmaların kontrolü ve reflü özofajitinin iyileşmesindeki faydasını ortaya koyan bir çalışma olmamasına rağmen, fizyolojik veriler doğrultusunda hastalara önerilmektedirler. Sigaranın azaltılması, geç öğünlerin terk edilmesi önerilir. Yatağın baş kısmının 15-20 cm kadar yükseltilmesi nokturnal ve laringeal yakınmaları olan

hastalar için faydalı olabilir, ancak diğer koşullarda gerekliliği tartışmalıdır. Reflüyü arttıran yağlı gıdalar, çikolata ve nane ile, AÖS basıncını azaltan alkollü içeceklerden kaçınılması önerilir. Ayrıca kola, portakal suyu gibi asidik içeceklerden kaçınılmalıdır. Yemeklerden sonra yatar duruma geçilmemelidir. Karın bölgesini sıkı saran giysiler giyilmemelidir. Sakız, pastil gibi salya sekresyonunu arttıran ürünler hafif şiddetteki pirozis hissi için faydalı olabilir. Obezite GÖRH, erozif özofajit ve özofagus adenokarsinomu için risk arttırıcıdır. Kilo verilmesi, etkisi her hastada benzer olmasa da önerilmelidir. (3).

2.3.2. Asit-Baskılayıcı Tedaviler

Reflü özofajit ve semptomatik GÖRH tedavisinde en etkili tedavi olup, tedavinin asıl amacı intragastrik pH' nın 4' ün üzerinde tutulmasını sağlamaktır (4).

Histamin-2 Reseptör blokörleri (H2RB)' nin, ciddi özofajitte etkileri kısıtlıdır, tedavi etkileri dozla birlikte artmaz. Öğünle uyarılan asit salgılanmasını baskılamakta yetersizdirler. Standart dozda kullanıldıklarında pirozisin kontrolünde 6 haftadan daha fazla etkili değillerdir (5). Standart dozlarda 8 haftalık tedavinin, % 40-60 oranında yakınmaları kontrol altına aldığı ve reflü özofajitini iyileştirdiği bildirilmiştir (6).

PPİ' leri günümüzde GÖRH' nin standart medikal tedavisi konumundadırlar. Günde tek doz PPİ (omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg, rabeprazol 20 mg, esomeprazol 20 mg), 8 hafta içerisinde hastaların % 80-90' ında özofajitin iyileşmesini sağlar (7,8). Aynı dozlarda uzun süreli idame tedavisinde de etkindirler, 12 ay süreyle PPİ kullanan hastaların % 80-90' ı asemptomatik olarak kaldığı bildirilmiştir (9). Daha yüksek dozda PPİ kullanımı gerekli olduğunda, günde tek doz yerine sabah ve akşam öğünlerinden önce birer kez kullanımları, intragastrik pH' nın kontrolü açısından daha üstündür (10).

PPİ, özofajitin iyileşmesinde H2RB' den daha hızlı ve etkilidir. Bir meta-analizde pirozis yakınmasında, bir hafta içerisinde tam iyileşme PPİ ile % 11.5 iken H2RB ile % 6.4 oranında saptanmıştır (11). Ayrıca H2RB' den farklı olarak PPİ' nin yüksek şiddetteki özofajitte etkileri doza bağlı olarak artış göstermektedir.

2.3.3. İdame Tedavisi

Erozif GÖRH' de, özofajitin relaps oranı yüksek olduğundan sıklıkla idame tedavisi gerekli olur (12). Hafif-orta dereceli olup, ağır özofajiti olmayan hastalarda

aralıklı PPI tedavisi ile başarılı sonuçlar alınabilir. Hafif-orta dereceli özofajiti olup endoskopi normal veya hafif özofajiti olan 677 hastanın alındığı bir çalışmada, remisyon sağlanan hastaların yakınmaları tekrarladığında 2-4 haftalık aralıklı tedavi uygulandığında başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (13).

2.4. Tanı

GÖRH tanısı klinik bir tanıdır, tanı başlanan antisekretuvar tedavi ile doğrulanabileceği gibi objektif testlerle de ortaya konulabilir.

2.4.1. Özofagoskopi

Endoskopi mukozal zedelenme ve Barrett metaplazisi (BM)' nin değerlendirilmesinde tek ve en iyi tanı yöntemidir. Genel olarak endoskopinin GÖRH tanısında duyarlılığı % 50' den azdır. Genel uzlaşsı endoskopinin başlangıç tanı yöntemi olarak, alarm yakınması olan (disfaji, kilo kaybı, anemi gibi) hastalar ile antisekretuvar tedaviden yarar görmeyen hastalara saklanması gerektiğidir (6). Bazı hastalarda ilk endoskopi normal olmasına rağmen özofajit bulguları takip eden işlemlerde ortaya çıkabilir (18). BM için, > 50 yaş, obez, 5-10 yıldan uzun süreli yakınması olan hastalar yüksek riskli grupta olup bu hastalara başlangıçta ve uzun süreli medikal tedavi alan hastalara tarama için, hayat boyunca bir kez endoskopi yapılması önerilmektedir. (19).

2.4.2. pH-metre

pH-metre, tipik veya atipik yakınmaları olmasına rağmen, endoskopide mukozal hasar tespit edilmeyen, özellikle de asit baskılayıcı tedaviden fayda görmeyen hastalarda tanının doğrulanmasında önemlidir. Asitle temasın paterni, sıklığı ve frekansı ile reflü ataklarıyla yakınmaların uyum gösterip göstermediği ortaya konabilir. Ayrıca yakınmaları devam eden hastalarda tedavi etkinliğinin izlenmesinde de faydalıdır. İşlem trans-nazal yolla özofagusa yerleştirilen bir kateter yardımıyla veya distal özofagusa tutturulan kablosuz, kapsüle benzer bir aygıt (BRAVO®) ile yapılabilir. Her ikisinde de pH algılayıcıdan alınan veriler, küçük taşınabilir bir kaydediciye yüklenir ve bilgisayar yardımıyla analiz edilir. Kateter şeklindeki pH elektrodu manometrik olarak tespit edilen alt özofagus sfinkterinin 5 cm kadar üzerine yerleştirilir. İşlem 24 saatte tamamlanır ve bu süre içerisinde diyet kısıtlaması uygulanmaz. Günümüzde teknolojik olanaklar özofagus yanında

hipofarinks ve intagastrik pH ölçümüne de olanak tanımaktadır. Özofagusta pH' nın 4' ün altına inmesi genel olarak fizyolojik ve patolojik reflüyü ayırmada, üzerinde uzlaşılabilir sınırdır (20).

2.4.3. Özofagiyal Manometri

Özofagiyal manometri özofagus fonksiyonlarını ve sfinkter basıncını ölçmekte faydalıdır. Ancak GÖRH tanısında hiçbir değeri yoktur. Sadece antireflü cerrahi öncesi değerlendirilmede ve akalazya gibi önemli motor bozuklukların tanısı için gerekli olabilir. Ayrıca taşınabilir pHmetre problemlerinin distal özofagusta uygun yere yerleştirilmesinde kullanılabilir (21).

2.4.4. Özofagografi

Baryumlu grafilerde, distal üçte bir özofagus mukozasında granüler veya nodüler görünüm saptanarak Reflü özofajiti tanısı konulabilir. Hafif dereceli GÖRH' de baryumlu grafilerin kullanımı sınırlıdır. Endoskopi ile karşılaştırıldığında tanısız geçiriliği hafif özofajitte % 25, orta özofajitte % 82, ağır özofajitte % 99 olarak saptanmıştır (22). İşlem sırasında reflünün gösterilmesi semptomatik hastaların % 25-71' inde, sağlıklı kontrollerin ise % 20 sinde saptanabilen bir bulgudur (23). Baryumlu grafiler peptik striktürün saptanmasına çok yararlıdır. Özellikle katı gıdaları yutmada güçlüğü olan hastalarda, antireflü cerrahisi planlanan hastalarda preoperatif olarak faydalıdır.

2.4.5. Histopatoloji

Pirozis hissi yakınması olan GÖRH hastalarının yaklaşık % 50-60' ında özofagus mukozası normal görünümündedir. Hastaların özofagus biyopsilerinde iyi tanımlanmış olan bazal hücre hiperplazisi, Rete çıkıntılarında uzama ve daha az olarak mukozanın içerisinde eozinofil ve/veya polimorfonükleer lökositler saptanabilirse de histopatolojik incelemenin GÖRH tanısında değeri oldukça sınırlıdır.

2.4.6. Antisekretuar Tedaviye Yanıt (PPI testi)

Yüksek dozda PPI ile antisekretuar tedaviye yanıt olası GÖRH tanısını destekler. Bir meta-analiz sonucuna göre PPI' ye yanıt, pHmetre gibi objektif yöntemlerle değerlendirildiğinde % 78 duyarlı ancak % 54 özgül olarak saptanmıştır (24).

2.5. Patofizyoloji

GÖRH' nin tam olarak nedeni bilinmemekte olup ortaya çıkışı birden çok nedene bağlanmaktadır. Hastalığın ortaya çıkması için özofagus epitelinin Reflü içeriğindeki asit ve pepsin ile yeterli süreyle teması gereklidir. Bunun için aşağıdaki mekanizmalardan, sıklıkla birden fazlasının rolü olduğu düşünülmektedir:

- a) Antireflü ve lüminal temizleme mekanizmalarında bozukluk sonucu asit/pepsinin sağlam epitelde hasara yol açması
- b) Normal asit temas süresine rağmen reflü olan içeriğin çok potent olması
- c) Özofagus epitelindeki direncin zayıf olması nedeniyle epitel hasarının oluşması.

2.5.1. Saldırgan faktörler

Teorik olarak gastrik sıvıdaki, hidroklorik asit, pepsin, safra asitleri (konjuge veya dekonjuge) ve pankreatik enzimler (tripsin, lipaz) özofagus epitelinde zedelenmeye yol açabilir. Ancak mide pH' sı asidik olduğunda asıl saldırgan etkenler, hidroklorik asit ve asit ortamda aktive olan pepsindir (25). Asidik ortamda dekonjuge safra asitleri ve pankreatik enzimler etki gösteremezler. Asit ortamda konjuge safra asitleri potansiyel olarak zedeleyici olabilirlerse de GÖRH' ye katkısı olmadığı ileri sürülmüştür (26). Birçok çalışmada da özellikle komplike GÖRH hastalarında duodeno-gastro-özofajiyal Reflü olduğunu gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Safra reflüsünün asit reflüsü ile birlikte, pirozise neden olduğu (27), ayrıca asitle birlikte, asitin tek başına yaptığından daha fazla yakınmaya yol açtıkları bildirilmiştir (28). Özofajiti olan hastalarda özofajiti olmayanlara göre reflü olan safra miktarı artmış olarak saptanmıştır (29). İntalüminal impedans yöntemi çalışmalarının erken sonuçlarına göre asit-dışı reflü sıklıkla postprandiyal dönemde olmakta ve asit reflüsü olmaksızın da yakınmalara neden olabilmektedir (30).

RE olan hastalarda, reflü olan materyalin içeriğindeki gastrik asit ve pepsin oranları açısından hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında belirgin fark saptanmamıştır (31). Bu sonuç, hastalığın ortaya çıkışının sadece asit fazlalığına bağlı değil, özofagus savunma sistemlerinin bir veya birkaçındaki bozulmaya da bağlı olduğunu göstermektedir.

2.5.2. Savunma faktörleri

Özofagus savunma sistemi üç bileşenden oluşmaktadır:

- 1) Özofagusa olan reflünün sıklığını ve içeriğin hacmini azaltan antireflü bariyeri
- 2) Reflü olan gastrik içerik ile özofagus epitelinin temas süresini azaltan lüminal temizleme mekanizmaları
- 3) Reflü içeriğindeki asit/pepsinin yol açacağı hasarı sınırlayan doku direnci.

2.5.2.1. Antireflü bariyeri

Antireflü bariyeri reflü olan içeriğe ilk karşı koyan savunma sistemidir. Birçok faktör antireflü bariyerine katkıda bulunursa da asıl bileşenler alt özofagus sfinkteri (AÖS) ve diyaframdır (32). Distal özofagusun 1-3.5 cm' lik kısmındaki sirküler kas tabakası AÖS' ni oluşturacak şekilde özelleşmiştir. Normalde karın boşluğundan göğüs boşluğuna doğru pozitif bir basınç gradiyenti mevcuttur. AÖS istirahat halinde kasılmış halde olup mide basıncından 10-30 mmHg daha yüksek bir basınç oluşturarak reflü oluşmasını engeller. Özofagus göğüs boşluğundan karın boşluğuna diyaframın *sağ crus'* undaki özofagiyal hiatusdan geçerek ulaşır. *Sağ crus'* u AÖS' yi çevreler, özellikle fiziksel efor sırasında sfinkteri destekler. İspirasyonda ve diğer intraabdominal basıncının arttığı durumlarda kasılarak eksternal sfinkter benzeri bir işlevi görür (33,34).

GÖRH hastalarında bulgu ve belirtileri ortaya çıkmasında gastrik asit en önemli rolü oynamaktadır. Ortalama asit temas zamanı, pHmetre bulgularındaki tüm reflü ataklarının sayısı ile sürelerinin çarpımının toplamını ifade etmektedir. Asit temas zamanı ne kadar uzunsa, antireflü bariyeri ve/veya lüminal asit temizleme mekanizmalarında o derece bozukluk var demektir. Günümüzdeki kanıtlar antireflü bariyeriyle ilgili en önemli etkenin geçici alt özofagus sfinkter gevşemeleri (TLESR=GAÖSG) olduğunu göstermektedir (35). Bu gevşemeler, gastrik fundusun gerilmesi sonucu vagal yolla gerçekleşen AÖS gevşemesi nedeniyle oluşur. Fizyolojik olarak GAÖSG, yutma sonrası midede biriken havanın dışarı atılmasını sağlar. Normalde AÖS, yutma sonrası 5-10 sn süreyle gevşeyerek gıdaların mideye geçişine izin verir. Yutma sonrası oluşan AÖS gevşemesi ile GAÖSG arasında farklılıklar mevcuttur, GAÖSG; faringeal kasılma olmadan oluşur, lümeni kapatan özofagus peristaltizmine eşlik etmez ve yutma sonrası oluşan gevşemelere kıyasla uzun sürelidir (>5-10 vs 20-30 sn), diyaframın inhibisyonu ile birlikte (36,37).

Yapılan çalışmalarda GAÖSG frekansının hastalarla sağlıklı kişilerde benzer olduğunu, ancak hastalarda bunların daha fazlasının asit reflüsü ile birlikte olduğunu

anlaşılmıştır. Diğer bir deyişle GÖRH hastalarında GAÖSG ile birlikte olan asit temas süresinin daha uzun olduğu bulunmuştur (38). Antireflü bariyeri reflü oluşumunu her zaman engelleyemez, sağlıklı kişilerde dahi günlük birçok kez reflü gerçekleşir.

NERD ve sağlıklı kişilerdeki asit reflüsünde asıl rolü GAÖSG oynar (39). RE' de de GAÖSG önemli iken iki etken daha önem kazanır ki, bunlar intraabdominal basınç artışıyla ortaya çıkan stres reflüsü ve AÖS yetersizliği nedeniyle oluşan serbest reflüdür (32,35,40). Her iki etkende GAÖSG' nin aksine düşük AÖS basıncıyla birlikte gelirler ve bu asit reflüsünün daha fazla olmasına yol açar. RE olgularında asit temas süresinin uzun olması bu şekilde açıklanmaktadır. Hiatal herni de asit temas süresinin uzamasına katkıda bulunur, düşük AÖS basıncı ve lüminal asit temizlenmesinde gecikmeyle birlikte (41).

Sağlıklı kişilerde de 24-saatlik aralığın % 10' una kadar ulaşan asit temas süreleri olabilir ve bu değerler erozif olmayan reflü hastalığında % 50, reflü özofajitinde % 30 hastada saptanabilir. Ayrıca her iki gruptan hastaların bir kısmında normalden daha kısa asit temas süresi saptanmaktadır ki bu hastalarda bozulmuş doku direnci söz konusudur (42).

2.5.2.2. Lüminal asit klerensi

Lüminal asit klerensinin 4 bileşeni vardır; yerçekimi, persitalizm, salya ve özofagus bezlerinin salgıları. Yerçekimi ve persitalizm bolus ile reflü olan içeriği temizler, salya ve özofagus bezlerinin salgıları ise reflü içeriğinin hacmi 1 mL' ye indiğinde etkili olur (43). GÖRH hastalarıyla sağlıklı kontroller arasında bolusun temizlenmesi veya tükrük salgısı açısından fark bulunmamıştır. Öte yandan özofajiti olan hastaların yaklaşık % 50' sinde intraözofagiyal asit temizlenmesinde uzama saptanmaktadır (44). GÖRH hastalarında en sık saptanan özofagus fizyolojisindeki anormallik etkili olmayan özofagus motilitesidir. Bu motilite bozukluğu tipik pirozis yakınması olan hastaların % 20' sinde, solunumsal yakınmaları olan hastaların ise % 50' sinde saptanmaktadır (45).

Lüminal asit klerensinde gecikme GÖRH oluşumunu tam olarak ortaya koymaya yeterli değildir çünkü sonuçta lüminal asit temizlenmesindeki gecikme birkaç dakikadır. Oysa ki tavşanlarda pH=2' iken saatler içerisinde ve Bernstein testinde pH=1.1' de 30 dk içerisinde özofagusta hasar oluşmadığı gösterilmiştir (46). Pepsinin katkısı dahil edilse de, hasarı sadece reflü olan içerikle açıklamak mümkün değildir, pepsin sadece pH<3 iken etkili olup, reflü olan içeriğin pH' ısı 3-4 arasındadır

(25). Bu sonuçlarda hastaların bir grubunda GÖRH patogenezinde doku direncinin önemli rol oynadığını göstermektedir.

2.5.2.3. Doku Direnci

Doku direnci, yapısal dinamik mukozal faktörler ve fonksiyonlarıyla zedelenmeyi en aza indirmeye çalışır, üç kısma ayrılabilir: pre-epitelyal, epitelyal, post-epitelyal.

Pre-epitelyal savunma zayıf gelişmiş olup özofagusta iyi tanımlanmış bir mukus tabakası veya bikarbonat salgısı mevcut değildir. İnsanlarda lüminal pH:2 iken bu özofagusta 10 kat azaltılır ve yüzey pH:3 olur, oysa ki aynı durumda mide yüzeyinde pH:6-7 olmaktadır, bu tamponlama kapasitesindeki, fark GÖRH hastalarında peptik ülserle kıyasla neden daha fazla asit supresyonu gerektiğini açıklar (47,48). Post-epitelyal savunma sistemi esas olarak kan akımı ile sağlanır. Kan akımı oksijen, besinler ve bikarbonat sağlar, H^+ ve CO_2 ' yi uzaklaştırarak epitelyal mukozal dirence destek olur.

Epitelyal savunma asıl savunma hattı olup, yapısal ve fonksiyonel bileşenlerden oluşmaktadır. Yapısal bileşenler hücre zarı ve hücrelerarası bağlantı kompleksinden oluşur, bunlar hücreler arasında HCl difüzyonunu azaltırlar. Reflü ilişkili zedelenmeye karşı bariyer fonksiyonunun stratum corneum tabakasında glikoproteinden zengin matriks içiçerisindeki sıkı bağlantılar (49) ve e-cadherin moleküllerinin ekstrasellüler kısımlarının birbirine adhezyonu ile oluşan intersellüler bağlantı kompleksinden (50) oluştuğu saptanmıştır. Doku direncinin fonksiyonel bileşenleri ise epitelyal hücrelerin asiti taşıyabilme ve tamponlayabilme kapasiteleriyle ilişkilidir. Hücre içi tamponlama fosfatlar, proteinler, bikarbonat ve son olarak karbonik anhidraz ile sağlanır (51). Tamponlama kapasitesi aşıldığında asit hücreden iki transmembran proteini aracılığı ile uzaklaştırılır: Na^+/H^+ değiştirici ve Na^+ bağımlı Cl^-/HCO_3^- değiştirici. Reflüye bağlı hücre asidifikasyonu sonrası bu pompalar hücre dışı Na^+ veya HCO_3^- ile H^+ iyonunu değiştirirler (52). Ancak tüm bu mukozal direnç mekanizmalarının sınırlı bir kapasitesi olup, bu potent asit, alkol, yüksek ısı, yüksek osmolalite veya sigara ürünleri aracılığı ile aşıldığında hastalık ortaya çıkmaktadır (53).

2.5.2.4. Sıkı Bağlantılar

Çok hücreli organizmalarda iç ortamın, dış ortamdaki izole edilmesi hayatın devamı için zorunludur. İzolasyon sonrası iç ortam birbirinden farklı boşluklara ayrılır. Bu izolasyon ve bölümlere ayırma epitel, endotel ve mezotel hücre katları tarafından yapılır. Bu hücre katlarının bariyer özelliğinde olabilmesi için çözünenlerin intersellüler aralığa sızmaları engellenmelidir. Bariyer fonksiyonu olarak adlandırılan bu görevi omurgalı canlılarda sıkı bağlantılar yerine getirir (54). Sıkı bağlantılar hücrelerin lateral membranlarının apikal kısmında yer alırlar, birbiriyle süreklilik gösteren anastomozlar halindedirler. Sıkı bağlantılar basit bariyerler olmayıp, fonksiyonları hücre tipine, fizyolojik gereksinimlere göre değişir. Geçirgenlikleri iyon ve büyüklüğe karşı seçicilik gösterir, bunu açıklayabilmek için içlerinde parasellüler kanallar olduğu ileri sürülmüştür. Epitelyal hücrelerin zarları birbirinden yapısal ve fonksiyonel olarak ayrı kısımdan oluşur: apikal ve bazolateral kısımlar. Bu kısımların protein ve lipid içerikleri birbirinden farklıdır, sıkı bağlantılar bu iki kısmın birbiriyle karışmasını engellemek için sürekli devam eden bir çit şeklinde apikal kısmı çevrelerler. Bu işlev sıkı bağlantıların 'çit fonksiyonu' olarak adlandırılır. Bu işlevin bozulması durumunda hücre polaritesini kaybeder, vektöryel bir iş üretemez. Bu işlev özellikle kanser hücresi biyolojisinde derinlemesine araştırılan bir konudur. İkinci fonksiyonları ise parasellüler aralıktan su ve çözünen maddelerin geçişinin düzenlenmesi yani 'bariyer fonksiyonu' dur. Sıkı bağlantıların oluşumu ve idameleri, bariyer fonksiyonu için daha geçerli olmak üzere ATP varlığına ve aktin hücre iskeletinin bütünlüğüne bağlıdır. Çit fonksiyonunda bozulma genel olarak kanser hücrelerinde görülmektedir. Over, endometrium, kolon gibi kanserlerde ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde ileri düzeyde diferansiyasyon bozukluğu varsa geç evrelerde sıkı bağlantılarını kaybetmektedirler. Bu konu tümör genезis ve metastaz gelişimi açısından araştırılmaktadır.

Bariyer fonksiyonunda bozulmayla ilgili uzun bir hastalık listesi çıkarılabilir. Sıkı bağlantılar bakteriler, virüsler ve allerjenlerin hedefi durumundadır. Bariyer fonksiyonunda bozulmanın bakteriyel gastrit, psödomembranöz enterokolit, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, çölyak hastalığı, kollajenöz kolit gibi gastrointestinal; sarılık, primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit gibi karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Diğer organlarla ilgili olarak multipl sklerozis, diyabetik retinopati, astım, kistik fibrosis, ovarian hiperstimulasyon sendromu gibi hastalıklar örnek olarak verilebilir (55).

1998 yılında klaudinlerin basit epitel hücrelerindeki sıkı bağlantıların en önemli molekülleri olduğu saptanmıştır (56). Klaudinler basit epitelin intersellüler sızdırmazlığında doğrudan katılırlar. Yine klaudinler çok katlı epitelin bariyer fonksiyonlarının yerine getirilmesinde anahtar rolü üstlenirler (57). Klaudinler 23 kDa ağırlığında 4 kısımlı transmembran proteinleridir. Birçok dokuda birden fazla klaudin tipi birlikte eksprese edilir. Heterojen klaudin tipleri tümleştirilerek karşılıklı çiftler halinde sıkı bağlantılar oluştururlar.

Okludinler ilk keşfedilen integral membran proteinleridir (58), ancak okludinlerin tek başlarına sürekli anastomozlar halinde devamlılık gösteren sıkı bağlantıların oluşumu için yeterli olmadıkları saptanmıştır (59). Öte yandan klaudinlerin keşfinden sonra yapılan çalışmalarda, okludin-eksik embriyonik kök hücrelerin normallerinden ayırt edilemeyen sıkı bağlantı dizileri oluturabildikleri saptanmıştır (60). Okludinler bazolateral zarların en apikal kısmında en belirgin olarak eksprese edilir ve sıkı bağlantıların en önemli immunohistokimyasal belirteçleridir.

JAM (*junctional adhesion molecule*)-1, JAM-2, JAM-3 ve CAR (*coxsackievirus and adenovirus Receptor*) ve ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecule*) sıkı bağlantıların yapısında yer alan immunoglobulin süperailisine üye olan proteinlerdir. Bu proteinler inflamatuvar hücrelerin ekstravazasyonu ve infeksiyon gibi inflamatuvar olaylarda rol alıyor gibi durmaktadır (61,62).

3. MATERYAL METOD

3.1. Hasta grubu

Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi'ne GÖRH uyumlu yakınmalar ile başvuran hastalardan;

- 18-65 yaş arasında olan, kadın veya erkek
- Tipik GÖRH yakınmaları ile başvuran
- Bilinen başka bir pankreatik, hepatobiliyer ve gastrointestinal sistem hastalığı veya bilinen bir sistemik hastalığı, geçirilmiş gastrointestinal cerrahi öyküsü olmayan
- Herhangi bir nedenle sonuçları etkileyebilecek Aspirin, NSAİİ, kalsiyum tabletleri gibi ilaç kullanmayan, son 6 hafta içerisinde asit baskılayıcı ilaç almamış
- Son 6 ay içinde *Helicobacter pylori* eradikasyonu için tedavi almamış, halen *H. pylori* gastriti açısından durumu bilinmeyen hastalarla çalışmaya katılmaları için görüşüldü.

3.2. Etik Kurul Onayı

Hastalar çalışmaya davet edildikten sonra bilgilendirildi, 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu' ile yazılı onayları alındı. Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu'ndan, 17.04.2006 tarih ve LUT 06/21 sayılı yazısı ile kurul onayı alındı.

3.3. Hasta değerlendirme formu

Çalışmaya dahil edilen hastaların semptomları, Türk populasyonu için düzenlenmiş olan 'GÖRH olgularının endoskopik bulgularının değerlendirilmesi: GÖRHEN' formuna kayıt edildi. Bu formun bir örneği aşağıda sunulmuştur:

GÖRH olgularının endoskopik bulgularının değerlendirilmesi: GÖRHEN

Yaş: () Erkek () Kadın Çalışmaya Alınma Tarihi:
Endoskopi istenme nedenleri:

Aşağıdaki 1. ve 5. soruları "hayır" olarak yanıtlayan olgular çalışmaya alınmayacaktır:

TIBBİ ÖYKÜ

1. Son bir yıl içinde göğüs kemiğinizin arkasında yanma veya ağrı oldu mu? (Yemek borusunda) (Lütfen mide ağrısı veya kalp ağrısını saymayın)

1. Hayır → Lütfen 5. soruya gidiniz
2. Evet → Devam ediniz

2. Bu şikayetiniz ne zamandır var?
 1. Son altı aydan beri
 2. 7 ay – bir yıl
 3. 1 ile 2 yıl
 4. 2 ile 5 yıl
 5. 5 ile 10 yıl
 - 6.10 ile 20 yıl
 7. 20 yıldan fazla
3. Son bir yıl içerisinde kaç kere bu şikayetiniz oldu?
 1. Ayda birden az
 2. Ayda bir
 3. Haftada bir
 4. Haftada birkaç kere
 5. Her gün
4. Göğüs kemiğinizin arkasında yanma veya ağrı şikayetinizin şiddeti nasıldır?
 1. HAFİF Aklıma gelmez ise farketmem
 2. ORTA Rahatsız ediyor ama günlük yaşantımı etkilemiyor
 3. AĞIR Günlük yaşantımı etkiliyor
 4. OLDUKÇA AĞIR Günlük yaşantımı çok fazla etkiliyor
5. Son 1 yıl içinde hiç ağzınıza acı, ekşi su veya yedikleriniz geldi mi?
 1. Hayır → Lütfen 9. soruya gidiniz
 2. Evet → Devam ediniz
6. Bu şikayetiniz ne zamandır var?
 1. Son altı aydan beri
 2. 7 ay – bir yıl
 3. 1 ile 2 yıl
 4. 2 ile 5 yıl
 5. 5 ile 10 yıl
 - 6.10 ile 20 yıl
 7. 20 yıldan fazla
7. Son bir yıl içerisinde kaç kere bu şikayetiniz oldu?
 1. Ayda birden az
 2. Ayda bir
 3. Haftada bir
 4. Haftada birkaç kere
 5. Her gün
8. Bu şikayetinizin şiddeti nasıldır?
 1. HAFİF Aklıma gelmez ise farketmem
 2. ORTA Rahatsız ediyor ama günlük yaşantımı etkilemiyor
 3. AĞIR Günlük yaşantımı etkiliyor
 4. OLDUKÇA AĞIR Günlük yaşantımı çok fazla etkiliyor
9. Son 1 yıl içinde hiç göğsünüzde ağrı oldu mu?
 1. Hayır → Lütfen 13. soruya gidiniz
 2. Evet → Devam ediniz
10. Göğüs ağrısı ne zamandır var?
 1. Son altı aydan beri
 2. 7 ay – bir yıl
 3. 1 ile 2 yıl
 4. 2 ile 5 yıl
 5. 5 ile 10 yıl

6. 10 ile 20 yıl
7. 20 yıldan fazla
11. Son bir yıl içerisinde kaç kere göğüs ağrısı oldu?
1. Ayda birden az
2. Ayda bir
3. Haftada bir
4. Haftada birkaç kere
5. Her gün
12. Göğüs ağrısı şikayetinizin şiddeti nasıl?
1. HAFİF Aklıma gelmez ise farketmem
2. ORTA Rahatsız ediyor ama günlük yaşantımı etkilemiyor
3. AĞIR Günlük yaşantımı etkiliyor
4. OLDUKÇA AĞIR Günlük yaşantımı çok fazla etkiliyor
13. Son 1 yıl içinde yemek yerken lokmalar boğazınıza takıldı mı veya yutmanızda güçlük oldu mu?
1. Hayır → Lütfen 17. soruya gidiniz
2. Evet → Devam ediniz
14. Bu şikayetiniz ne zamandır var?
1. Son altı aydan beri
2. 7 ay – bir yıl
3. 1 ile 2 yıl
4. 2 ile 5 yıl
5. 5 ile 10 yıl
6. 10 ile 20 yıl
7. 20 yıldan fazla
15. Son bir yıl içerisinde kaç kere yutma güçlüğü oldu?
1. Ayda birden az
2. Ayda bir
3. Haftada bir
4. Haftada birkaç kere
5. Her gün
16. Yutma güçlüğü şikayetinizin şiddeti nasıl?
1. HAFİF Aklıma gelmez ise farketmem
2. ORTA Rahatsız ediyor ama günlük yaşantımı etkilemiyor
3. AĞIR Günlük yaşantımı etkiliyor
4. OLDUKÇA AĞIR Günlük yaşantımı çok fazla etkiliyor
17. Yemeği yutarken ağrı oluyor mu?
1. Hayır
2. Evet
18. Son bir yıl içinde parlak kırmızı renkte kan kustunuz mu?
1. Hayır
2. Evet
19. Son bir yıl içinde toplam süresi üç ayı aşan öksürük yakınmanız oldu mu?
1. Hayır
2. Evet
- Günde kaç kez?
- Haftada kaç gün?
- Son bir yıl içinde öksürük nedeniyle uykunuzdan uyandınız mı?
1. Hayır 2. Evet

20. Son bir yıl içinde hiç ses kısıklığınız, müzmin boğaz sorunuz (kr. farenjit) oldu mu?

1. Hayır
2. Evet

21. Son bir yıl içinde herhangi bir mide ilacı kullandınız mı?

0. Hiç kullanmadım
1. Ayda bir kereden az
2. Ayda bir kere
3. Haftada bir kere
4. Haftada birkaç kere
5. Her gün
6. Şikayetim oldukça

Proton pompa inhibitörü:

H2 Reseptör antagonisti:

Antasit:

22. Son bir yıl içinde mide ağrısı oldu mu? (Lütfen adet sancıları ve göğüs ağrısını saymayınız)

1. Hayır → Lütfen 17. soruya gidiniz
2. Evet → Devam ediniz

23. Mide ağrısı ne zamandır var?

1. Son altı aydan beri
2. 7 ay – bir yıl
3. 1 ile 2 yıl
4. 2 ile 5 yıl
5. 5 ile 10 yıl
6. 10 ile 20 yıl
7. 20 yıldan fazla

24. Son bir yıl içerisinde kaç defa mide ağrısı oldu?

1. Ayda birden az
2. Ayda bir
3. Haftada bir
4. Haftada birkaç kere
5. Her gün

25. Mide ağrısı şikayetinizin şiddeti nasıl?

1. HAFİF Aklıma gelmez ise farketmem
2. ORTA Rahatsız ediyor ama günlük yaşantımı etkilemiyor
3. AĞIR Günlük yaşantımı etkiliyor
4. OLDUKÇA AĞIR Günlük yaşantımı çok fazla etkiliyor

26. Size daha önce hiç yemek borusu veya mide hastalığınız olduğu söylendi mi?

1. Hayır
2. Evet

Hangi hastalık olduğu söylendi, ne zaman

Alkol: cc/gün Cins: Süre: yıl

Sigara: adet/gün Süre: yıl

ÜST GİS ENDOSKOPİSİ

Özofagus: Özofajit (LA Sınıflaması) () Yok () A () B () C () D

Barrett özofagusu () Yok () Kısa segment (< 3 cm) () Uzun segment ()

() Çepecevre () Adacık () Dilcik

Tytgat sınıflaması: C (circumferential extent): cm/ T (total extent): cm
Striktür: () Yok () Var

Hiatus Hernisi: () Yok () Var cm

Diğer:

Mide:

Antrum Üreaz / CLO test: () Bakılmadı () Negatif () Pozitif

Korpus Üreaz / CLO test: () Bakılmadı () Negatif () Pozitif

Duodenum:

3.4. pH-metre

24 saatlik pH-metre çalışmaları taşınabilir, dijital veri kaydedici (Digitrapper Mark III, Synetics AB, Sweden) ve buna bağlanan tek sensörlü, monokristalin antimoni pH sensitif elektrodu (Synetics AB, Sweden) ile yapıldı. Her testten önce cihaz programlandıktan sonra pH: 7.01 ve 1.07 olan solusyonlarda invitro kalibre edildi. Burun yolundan yutturulan elektrodun distal pH sensörü endoskopik olarak belirlenen AÖS üst sınırının 5 cm proksimaline tesbit edilerek, yaklaşık 24 saat süre ile kayıt alındı. 24 saatlik kaydın sonunda depolanan bilgiler bilgisayara aktarıldıktan sonra *Polygram for Windows (Ver 2)* programı ile analiz edildi. 24 saatlik pH eğrisi ve şu parametreler yazdırıldı:

- 1) Özofagusta pH' nın 4.0 ' ın altında olduğu total reflü süresi (dakika)
- 2) Total reflü süresinin %' si (% pH < 4.0)
- 3) Total reflü sayısı
- 4) 5 dakikadan uzun reflü sayısı
- 5) En uzun reflünün süresi (dakika)
- 6) De Meester skoru

pH-metre takıldıktan sonra hastalar evlerine gönderildi, beslenme ve fizik aktivitelerini, mümkün olduğunca normal günlük yaşantılarındaki gibi devam ettirmeleri istendi. Takip süresince hastaların gece uykusu dışında yatmalarına, asitli gıdalar ve alkol almalarına, herhangi bir ilaç kullanmalarına izin verilmedi. Hastalardan yemek saatlerini, pozisyonlarını, uyku saatlerini gösteren günlük tutmaları istendi. Reflü atağının başlaması, özofagial pH' nın 4' ün altına düşmesi, bitmesi ise özofagial pH' nın 4' ün üzerine çıkması olarak tanımlandı. Özofagustaki pH' nın 4' ün altında kalan zaman %' si 4.2' den fazla bulunduğunda patolojik reflü olarak kabul edildi.

3.5. Endoskopi

Tüm hastalara özofagogastroduodenoskopi yapıldı. İşlem % 10 lidokain ile lokal farinks anestezisini takiben Olympus GIF 230 video gastroskop ile yapıldı. Tüm hastalardan antrum ve korpustan hızlı üreaz testi için (CLO testi) birer adet biyopsi alındı. Histopatolojik inceleme için özofagus distalinden (kardiyoözofagiyaal bileşkenin 2 cm kadar proksimalinden, her 4 kadrandan birer adet) biyopsiler alındı. Biyopsi bölgesi değiştirildiğinde (antrum-korpus-özofagus) forseps de değiştirildi ve endoskop kanalı 30 cc steril serum fizyolojik ile yıkandı. Üreaz testinin pozitif olması halinde *H. pylori* (+) kabul edildi. Hiatal herni varlığı Z-çizgisinin diafragmatik hiatustan 2 cm den daha yukarda olması olarak tanımlandı. Reflü özofajiti Savary-Miller sınıflamasına göre deRecelendirildi. Hastalar ilk endoskopik değerlendirmelerine göre; NERD: İlk endoskopik incelemede reflü özofajiti saptanmayan hastalar ve RE: İlk endoskopik incelemede reflü özofajiti saptanan hastalar şeklinde iki gruba ayrıldı.

3.6. Tedavi

Testleri tamamlanan tüm hastalar yaşam tarzı değişiklikleri ve diyet konusunda bilgilendirildi, en az 6 haftalık, standart dozda PPI 2x40 mg/gün tedavisi başlandı. *Helicobacter pylori* gastriti saptananlara, PPI tedavisi yanında, klaritromisin 2x500 mg/gün ve amoksisilin 2x1 gr/gün şeklinde üçlü eradikasyon tedavisi verildi.

3.7. Histopatolojik İnceleme

Alınan özofagus biyopsilerinin immünohistokimyasal incelemeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' nda gerçekleştirildi.

3.7.1. Örneklerin Hazırlanması

Alınan doku örnekleri -196 °C sıvı azot içerisinde donduruldu. Antijenitesi bozulmadan kesitlerin elde edilebilmesi için kesit alınana kadar doku örnekleri -196 °C sıvı azot tankı içerisinde ideal olarak 2-3 gün bekletildi. Kriyostat (Leica Frigocut 2800E) ile 7 µm kalınlığında seri kesitler önceden jelatinle kaplanmış lamlara alındı. Oda ısısında kurutulduktan sonra silikajel (Merck, K.No:1.01925, Darmstadt,

Almanya) kullanılarak nemi alınmış kapalı kutularda immün işaretleme uygulanana kadar saklandı (ideal olarak 1-4 gün).

3.7.2. Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması

Jelatinli lam

Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)

Fosfat tamponlu serum fizyolojik-sığır serum albumini (PBS-BSA) karışımı

Primer antikor

- Sekonder antikor

- Sıvı diamino benzidin (Sıvı DAB+)

- Bakır sülfat solüsyonu

- Mayer'in Hematoksileni

- Propidium Iodide/Antifade (Oncor, K. No:S1370-6, ABD)

Jelatinli lam hazırlanması

Jelatin tozu (gelatin) (Sigma, G-6650, ABD)	5 gr
Kromalumsülfat (Chrom (III)-Kaliumsulfat) ($KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) (Merck, K.No: K-2830535, Almanya)	0.5 gr
Distile su	1000 ml

Belirtilen miktarlarda jelatin tozu ve kromalum sülfat 1000 ml distile su içinde ısıtılarak ve karıştırılarak eritildi. Kaynadıktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Rodajlı lamalar bir asansöre dizildi ve yarı yarıya %70' lik alkol ve eter karışımından geçirilerek temizlendi, kurutuldu. Rodajlı lamalar kuruduktan sonra soğumuş olan jelatin solüsyonundan geçirildi ve tekrar kurumaya bırakıldı.

Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) hazırlanması

Solüsyon I :

Sodium dihydrogen phosphate monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (Merck, K.No:3090, Darmstadt, Almanya)	13.7 gr
Sodium chloride (NaCl) (Merck, K.No: 6408, Darmstadt, Almanya)	87.66 gr
Distile su	1000 ml

Solüsyon II:

Disodyum hidrojen orthophosphate dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (BDH Chemicals, K.No: 30157)	71.2 gr
---	---------

Sodium chloride (NaCl)	350.64 gr
(Merck, K.No: 6408, Darmstadt, Almanya)	
Distile su	4000 ml

Stok solüsyonu: Hazırlanan solüsyon I ve solüsyon II ayrı ayrı süzöldükten sonra 4000 ml solüsyon II + 500 ml solüsyon I karıştırıldı. Bir pH-metre yardımı ile gerekirse solüsyon I eklenerek stok solüsyonun pH' sı 6,9'a ayarlandı.

Kullanma solüsyonu: Stok solüsyonu 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı. Yine aynı şekilde gerekirse solüsyon I eklenerek kullanma solüsyonunun pH' sı 7,4 olarak ayarlandı.

Fosfat tamponlu serum fizyolojik - sığır serum albumini (PBS-BSA) hazırlanması: Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içine 1/40 oranında %30'luk BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma K.No: A-3174) temiz bir enjektörle eklenerek hazırlandı.

3.7.3. Antikorlar

Primer Antikorlar

Çalışmada kullanılan primer antikorlar (Tablo-1) önerilen oranlarda (1/50) PBS-BSA (phosphate buffer solution-bovine serum albumin) karışımı ile sulandırılarak kesitler üzerine damlatıldı.

Özgüllük	Isotip	Klon adı	Kaynağı
Klaudin-1	Rabbit Ig	MH44	Zymed, ABD
Klaudin-2	Rabbit Ig	JAY.8	Zymed, ABD

Tablo-1: Kullanılan primer antikorların özgüllüğü, klon adı ve kaynağı

Sekonder antikorlar

a) İndirekt immünoperoksidaz boyama yöntemi için:

Anti-rabbit IgG-Peroksidaz (Zymed, K. No: 65-6120, ABD)

PBS-BSA

Normal insan serumu

Anti-rabbit IgG-Peroksidaz (Zymed) immünoglobülini hazırlanmış olan PBS-BSA solüsyonu ile 1/100 oranında sulandırıldı. Bu solüsyona 1/100 oranında normal insan serumu eklendi.

b) İndirekt immünoFloREsan boyama yöntemi için:

Goat Anti-rabbit IgG/FITC (Zymed, K. No: 65-6111, ABD)

PBS-BSA

Normal insan serumu

Goat Antirabbit IgG/FITC (Zymed) immünoGlobülini hazırlanmış olan PBS-BSA solüsyonu ile 1/25 oranında sulandırıldı. Bu solüsyona 1/100 oranında normal insan serumu eklendi.

Kromojen: Diaminobenzidin (DAB) (Dako, K. No: K3468, ABD)

Kromojen olarak sıvı DAB+ kullanıldı.

Bakır Sülfat (CuSO₄) solüsyonu hazırlanması

Bakır sülfat (Copper II sulphate: CuSO ₄) (Carlo Erba, K.No: 364757)	5 gr
%0.9 NaCl	1000ml

DAB reaksiyonunun güçlendirilmesi amacıyla, 1000 ml serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içine 5 gr bakır sülfat eklenerek iyice karıştırılıp eritilerek %0.5'lik bakır sülfat solüsyonu kullanıldı.

Mayer'in hematoksilininin hazırlanması

Aluminyum potasyum sülfat (KAl(SO ₄) ₂ .12 H ₂ O) (Sigma, K.No:A 7167)	50 gr
Hematoksilen (Sigma, K.No:H 9627)	1.0 gr
Sodyum iyodit (NaIO ₃) (Sigma, K.No:S 407)	0.2 gr
Kloralhidrat (C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂) (Sigma, K.No:C 8383)	50 gr
Distile su	1000 ml
Sitrik asit (monohidrat) (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O) (Sigma, K.No:C 7129)	1.0 gr

Yukarıda belirtilen reçeteye uygun olarak 1 gr hematoksilin 1000 ml distile suda eritildi. İyice eridikten sonra 0.2 gr sodyum iyodit eklendi. Bu karışım, 50 gr aluminyum potasyum sülfat ile manyetik karıştırıcıda tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. Daha sonra kloralhidrat ve sitrik asit eklendi. Boya kullanılmadan önce süzüldü.

3.7.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama

İmmün boyama, yukarıda örneklerin hazırlanması başlığında tanımlandığı biçimde jelatin kaplı rodajlı lamlara alınmış olan kesitlere aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanarak gerçekleştirildi.

1. Kesitler, “molecular sieve” (Merck, K.No: 5704) eklenerek suyu alınmış saf asetonunda, oda ısısında 10 dakika tespit edildi,
2. 30 dakika kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri pap-pen (Zymed Laboratories inc. K.No:71310) ile sınırlandırıldı,
3. Uygun şekilde sulandırılmış primer antikorlar kesitlere damlatıldı ve nem odasında (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet) 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi,
4. Şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
5. Uygun şekilde hazırlanmış olan sekonder antikor kesitlerin üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle nem odasında bekletildi.
6. Tekrar şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
7. Kesitlerin üzerine sıvı DAB damlatıldı ve 10 dakika süreyle nem odasında inkübe edildi,
8. Şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süreile yıkandı,
9. Yine şale içinde lamlar serum fizyolojik ile yıkandı,
10. %0.5'lik bakır sülfat solüsyonu içinde lamlar 20 dakika oda ısısında bekletildi,
11. Lamlar şale içinde distile suda yıkandı,
12. Çekirdek boyanması kontrol edilerek 30 saniye-1 dakika süreyle Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama yapıldı,
13. Lamlar musluk suyunda yıkandı,
14. Dehidratasyon için sırasıyla; %50, %60, %70, %80, %96 (iki değişim) ve %100'lük (iki değişim) alkollerde 5'er dakika bekletildi,
15. Lamların üzerindeki kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilolde bekletilerek dokular şeffaflaştırıldı,
16. Entellan kullanılarak kesitler kapatıldı.

Kontrol amacıyla boyanan kesitlerde, primer antikor basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı. İndirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış lenf düğümü kriyostat kesitleri Leica DMR Research Microscope- Germany mikroskobunda değerlendirildi ve Leica DC 500 kamera ile görüntüleri alındı.

3.7.5. İndirekt İmmüno Floresan Boyama

İmmün boyama, yukarıda örneklerin hazırlanması başlığında tanımlandığı biçimde jelatin kaplı rodajlı lamlara alınmış olan kesitlere aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanarak gerçekleştirildi.

1. Kesitler, moleküler sieve (Merck, K.No: 5704) eklenerek suyu alınmış saf asetonunda, oda ısısında 10 dakika tespit edildi,
2. 30 dakika kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri pap-pen (Zymed Laboratories inc. K.No:71310) ile sınırlandırıldı,
3. Uygun şekilde sulandırılmış primer antikorlar kesitlere damlatıldı ve nem odasında (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet) 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi,
4. Şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
5. Uygun şekilde hazırlanmış olan sekonder antikor kesitlerin üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle ışıktan korunarak nem odasında bekletildi.
6. Tekrar şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile ışıktan korunarak yıkandı,
7. Yine şale içinde lamlar distile su ile yıkandı,
8. Çekirdek boyanması için propidium iodide/ antifade (Oncor, K.No: S1370-6, ABD) kesitlerin üzerine birer damla damlatıldı.
9. Lamel ile kesitlerin üzeri kapatıldı ve ışıktan korunarak saklandı.

Kontrol amacıyla boyanan kesitlerde, primer antikor basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı.İmmüno floresan yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış kesitler Leica DMR Research Microscope- Germany mikroskobunda değerlendirildi ve Leica DC 500 kamera ile görüntüleri alındı.

4. SONUÇLAR

4.1. Hasta grupları

Hastalar, 9 kadın, 4 erkek toplam 13 bireyden oluşmaktaydı. Hastaların yaşları 22-46 arasında değişmekteydi. NERD grubu, 5 kadın 2 erkek (ortalama yaş 32 (31-45)); RE grubu, 4 kadın, 2 erkek (ortalama yaş 27 (22-46)) hastadan oluşmaktaydı (Tablo-1).

NERD			RE		
Hasta	Cins	Yaş	Hasta	Cins	Yaş
1	K	45	1	E	31
2	E	37	2	E	22
3	K	31	3	K	46
4	K	34	4	K	22
5	K	39	5	K	33
6	E	44	6	K	40
7	K	33			

Tablo-2: Hastaların demografik özellikleri

4.2. Endoskopik inceleme

Hastaların ilk endoskopik incelemelerinin sonuçları gruplara göre Tablo-3' gösterilmiştir.

NERD		RE	
1	Pangastrit	1	Antral gastrit Evre 2 özofajit
2	Pangastrit	2	Evre 1 duodenit, Nodüler Gastrit, Küçük Çaplı Hiatal Herni, Evre 2 Özofajit
3	Antral gastrit	3	Antral gastrit Evre 2 özofajit
4	Evre 2 duodenit Antral gastrit	4	Evre 2 Duodenit, Nodüler gastrit, Küçük Çaplı Hiatal Herni, Evre 2 özofajit, Kısa segment BM
5	Antral gastrit	5	Antral gastrit Evre 2 özofajit
6	Antral nodüler gastrit	6	Pangastrit, Evre 2 özofajit Küçük Çaplı Hiatal Herni
7	Normal		

Tablo-3: Hastaların gruplara göre endoskopi sonuçları

4.3. Hızlı üreaz testi

NERD grubunda 47 hastanın, RE grubunda ise 36 hastada *Helicobacter pylori* pozitif olarak saptandı (Tablo-4).

NERD		RE	
1	+	1	-
2	+	2	+
3	+	3	+
4	-	4	+
5	-	5	-
6	+	6	-
7	-		

Tablo-4: Gruplara göre hızlı üreaz testi sonuçları

4.4. pH-metre

Hastalara uygulanmış olan intraözofagiyal pH monitorizasyonu raporlarının dökümü gruplara göre Tablo-5' de gösterilmiştir.

NERD	1	2	3	4	5	6	7
Total Reflü atağı sayısı	198	260	195	97	103	226	666
% süre PH < 4, total süre	7.3	9.5	8.6	3.8	86.7	11.2	24.1
% süre pH < 4, ayakta	20.3	17.9	8.1	7	86.9	7.7	42.7
% süre pH < 4, yatarak	3.8	0.7	9.3	0.4	86.4	14.9	4.1
>5dk Reflü episodü, total	0	0	2	1	11	6	6
En uzun Reflü süresi (dk, total)	1.2	1.1	2.8	1.6	82.7	3.4	1.8
De Meester skoru	36.4	38.6	42.5	16.4	287.5	53.6	101.0
RE	1	2	3	4	5	6	
Total Reflü atağı sayısı	201	279	248	461	92	240	
% süre PH < 4, total süre	10	36.7	10	25	4.2	71.4	
% süre pH < 4, ayakta	20.6	29.9	18.7	35.8	8.5	41.8	
% süre pH < 4, yatarak	0.1	51.5	5.4	15.8	0.2	97.5	
>5dk Reflü episodü, total	2	14	1	10	0	15	
En uzun Reflü süresi (dk, total)	5	17.1	0.8	2.8	2	32	
De Meester skoru	43.5	145.5	42.5	100.7	14.7	234.8	

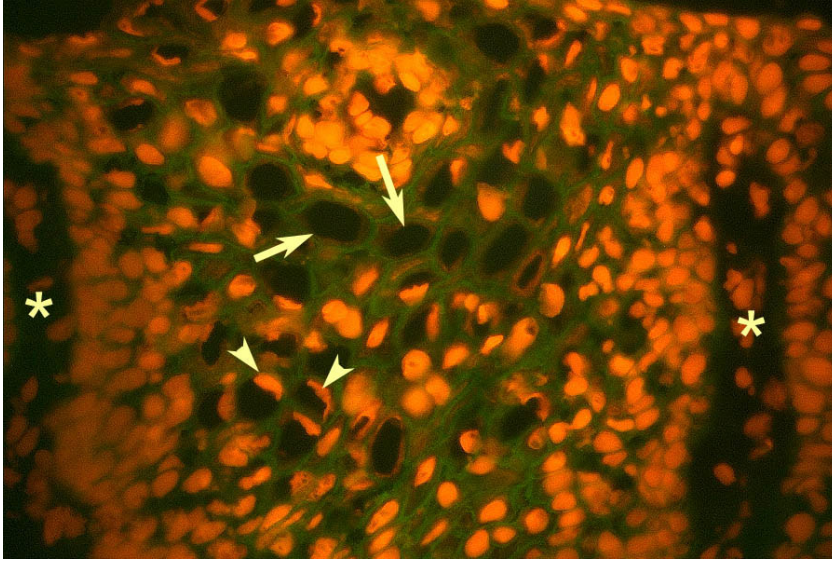
Tablo-5: Gruplara göre pH-metre sonuçları

4.5. Histopatolojik inceleme

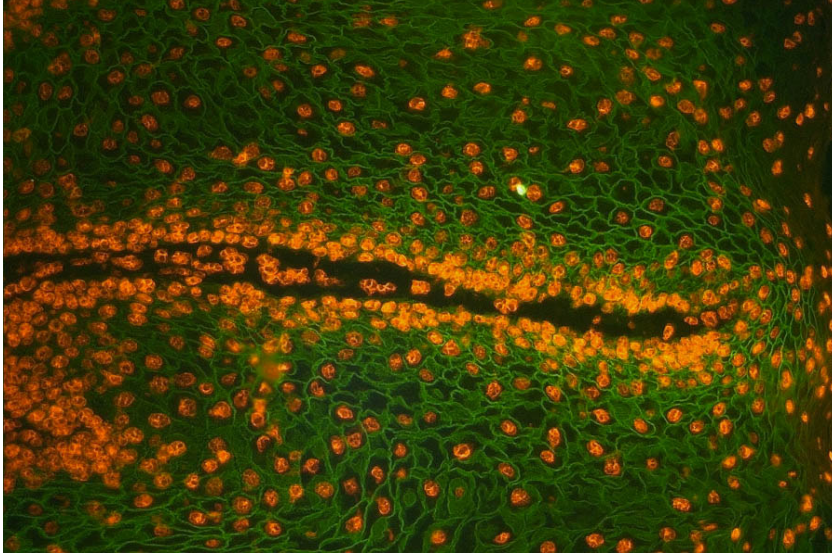
Doku örnekleri 4 grupta incelenmiştir:

1. grup: RE, tedavi öncesi
2. grup: RE, tedavi sonrası
3. grup: NERD, tedavi öncesi
4. grup: NERD, tedavi sonrası

RE olgularının histopatolojik değerlendirmesinde epitel hücrelerinin çekirdeklerinde yer yer kromatin erimesi, yer yer de piknozu düşündürülecek ölçüde periferik kromatin yoğunlaşması gözlemlendi. Bu durumun, epitel hücrelerinin çekirdeklerinin özellikle ara poligon tabakada görülemeyecek ölçüde küçülmesiyle sonuçlandığı gözlemlendi. Çok katlı yassı epitel hücrelerinde vakuolizasyon, epitel-lamina propria bileşkesinde derin papillaların oluşması, bazal hücre hiperplazisi ve epitel proliferasyonu sonucu epitelde kalınlaşma özofajit bulgusu olarak dikkati çekti (Resim 1-2). Tedavi sonrası (grup 2) belirgin bir histopatolojik değişim saptanmadı (Resim 3).

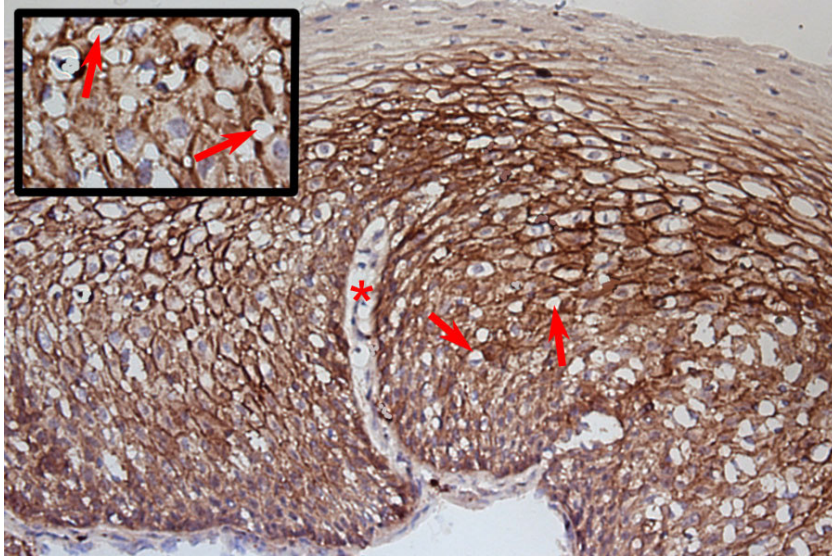


Resim 1: RE grubuna ait bir kesitte epitel hücrelerinin çekirdeklerindeki yer yer kromatin erimesi (ok), yer yer de periferik kromatin yoğunlaşması (ok başı) izlenmektedir. Epitel-lamina propria bileşkesinde oluşan derin papillalar asteriks ile gösterilmiştir (*). Bazal hücre hiperplazisi ve epitel proliferasyonu sonucu epitelde kalınlaşma dikkati çekmektedir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X40.



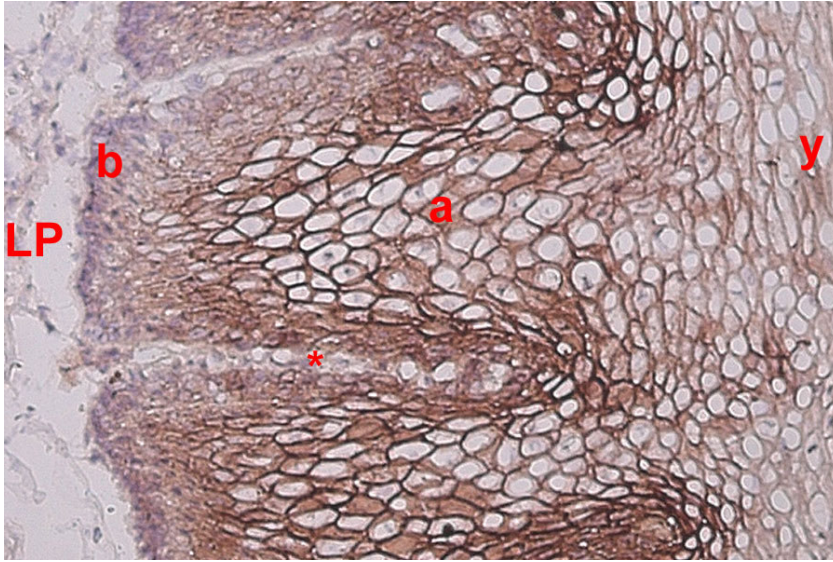
Resim 2: RE grubuna ait bir başka olgudan alınan biyopside epitel-lamina propria bileşkesinde oluşan derin papilla, bazal hücre hiperplazisi ve epitel proliferasyonu sonucu epitelde kalınlaşma dikkati çekmektedir. FITC işaretli indirekt immunoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.

Resim 3 (aşağıda): İkinci gruba ait bir kesitte epitel-lamina propria bileşkesinde oluşan derin papillalar (*), bazal hücre hiperplazisi ve epitel proliferasyonu sonucu epitelde kalınlaşma izlenmektedir. Çok katlı yassı epitel hücrelerinde vakuolizasyon (↑). İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilin zemin boyaması, orijinal büyütme X20. Küçük Resim: Büyük büyütmede epitel hücrelerindeki vakuolizasyon okla gösterilmiştir. Orijinal büyütme X40.



NERD olgularının histopatolojik değerlendirmesinde ise RE olgularında olduğu gibi epitel çekirdeklerinde yer yer kromatin erimesi, yer yer de piknozu düşündürecek ölçüde periferik kromatin yoğunlaşması gözlemlendi. Epitel-lamina propria bileşkesinde derin papillaların oluştuğu, bazal hücre hiperplazisi sonucu epitelde kalınlaşma olduğu gözlemlendi (Resim 4). RE' de gözlenen çok katlı yassı epiteldeki vakuolizasyon, bu olgularda dikkati çekmedi. Tedavi sonrası (grup 4) belirgin bir histopatolojik değişim saptanmadı.

Resim 4 (aşağıda): Non-erozif Reflü grubuna ait bir kesite ait mikrografta epitel hücrelerinin çekirdeklerinde yer yer kromatin erimesi, yer yer periferik kromatin yoğunlaşması görülmektedir. Epitel-lamina propria bileşkesinde derin papillaların oluştuğu, bazal hücre hiperplazisi sonucu epitelde kalınlaşma olduğu izlenmektedir. LP: Lamina propria, b: epitel bazal tabakası, a: ara poligonik tabaka, y: yüzeysel tabaka, *: papilla. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.



4.6. İmmunohistokimyasal bulgular

İmmunohistokimyasal incelemeler yukarıda tanımlanan gruplardaki tüm doku örnekleri için, immünoperoksidaz ve immünofloresan yöntemlerinin her ikisi de kullanılarak gerçekleştirildi. İmmünoperoksidaz incelemeler doku ayrıntısını daha iyi saptamak ve ekspresyonu daha kolay lokalize etmek için tercih edildi. Klaudin-1 için immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak yapılan incelemede reaktiviteye bağlı olarak ekspresyonun şiddeti 1'den 4'e kadar derecelendirme yaparak değerlendirildi (Tablo

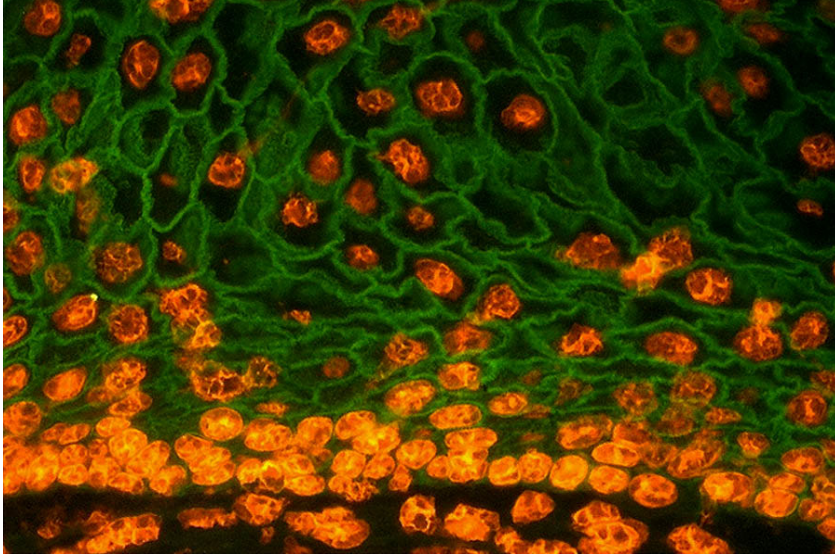
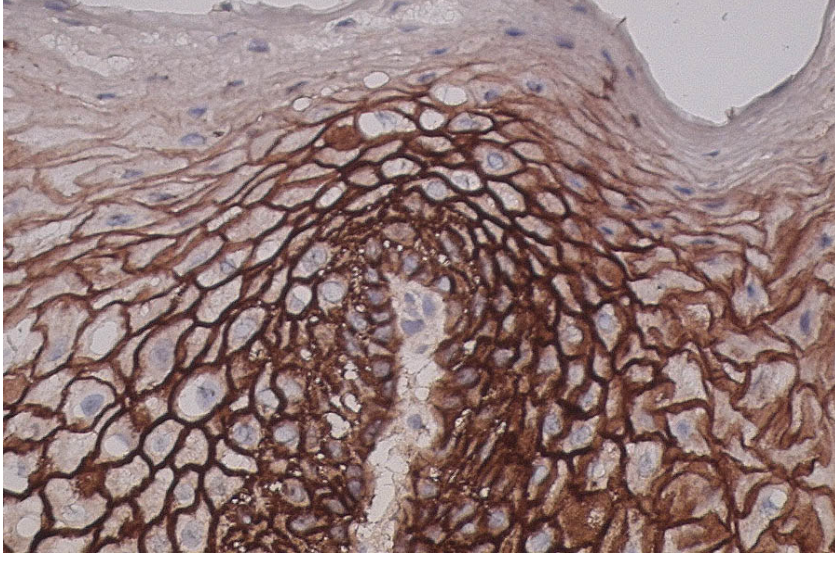
1-4). İmmünofloresan incelemeler ise özellikle zayıf şiddetteki reaksiyonlar için belirleyici yöntem olarak uygulandı ve her iki yöntem ile yapılan incelemeler birbirlerini doğrulayıcı ve/veya tamamlayıcı nitelikteydi. Ancak az sayıda olguda uygulanan her iki yöntem ile gözlenen bulgular arasında minör farklılıklar saptandı.

4.6.1. Reflü özofajit tedavi öncesi

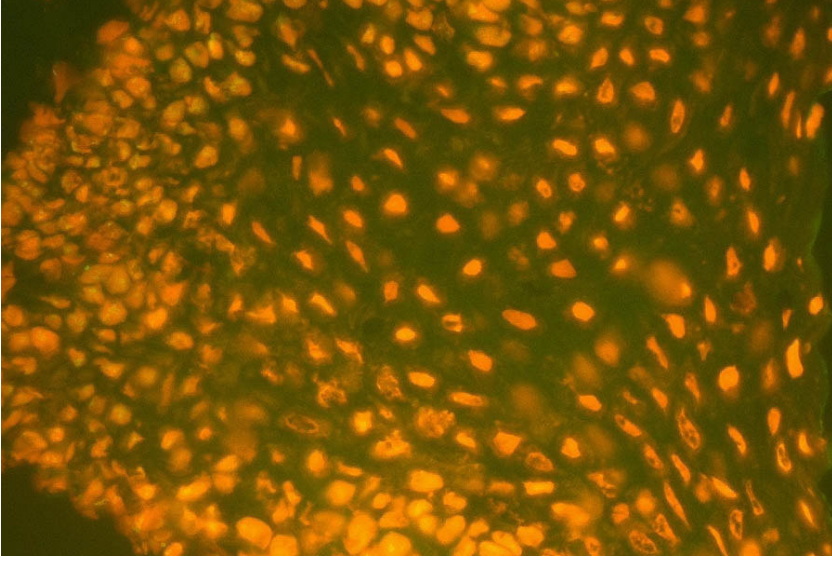
Klaudin-1 ekspresyonu özellikle ara poligonal tabaka hücrelerinde plazma membranında ve bazı olgularda plazma membranına komşu sitoplazmada izlendi (Resim 2, 5, 6). Bu grupta olguların hemen hepsinde özofagus çok katlı yassı epitelinin bazal tabakasında da klaudin-1 ekspresyonunun olduğu görüldü (Resim 5) (Tablo 1). Uygulanan immünoperoksidaz ve immünofloresan yöntemleri karşılaştırıldığında bazal tabakadaki klaudin-1 reaktivitesi yönünden farklılık gözlemlendi. Bazı olgularda bazal tabakada immünoperoksidaz yöntemi ile ekspresyon gözlenirken, aynı olguların seri kesit immünofloresan işaretli örneklerinde zayıf reaksiyon saptandı ya da reaksiyonun bulunmadığı belirlendi.

Aynı grubun klaudin-2 için yapılan incelemelerinde, özofagus epitelinde herhangi bir reaksiyon saptanmadı (Resim 7). Ancak bazı olgularda epitelde ve özellikle bazal tabakadaki çekirdeklerde negatif kontrole kıyasla özgül olmayan zemin boyanması niteliğinde bir reaksiyonun varlığı belirlendi. İlginç olarak, epitel bazal membranında bu yapıyla sınırlı zayıf şiddette bir reaksiyonun varlığı da dikkati çekti. Bu antijen için reaksiyonun başlıca lamina propriada yerleşik bezlerin apikalinde olduğu saptandı. Bezlerin salgı ürünlerinde de non-spesifik olarak değerlendirilen bir reaksiyon mevcuttu (Resim 8). Biyopsi alanlarında izlenen komşu mide yüzey ve bez epitelinde yukarıda tanımlanana benzer bir reaksiyonun olduğu izlendi (Resim 9).

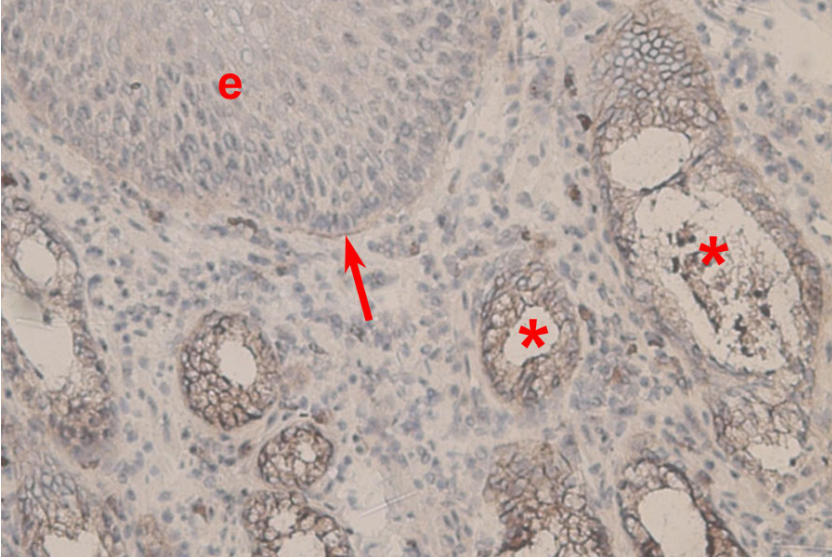
Resim 5 (aşağıda): RE grubuna ait bir kesitte çok katlı yassı epitelin bazal ve ara poligonal tabakalarında güçlü klaudin-1 ekspresyonu izlenmektedir. Yüzeyel kattaki yassı epitel hücrelerinde reaksiyon gözlenmemektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilin zemin boyaması, orijinal büyütme X40.



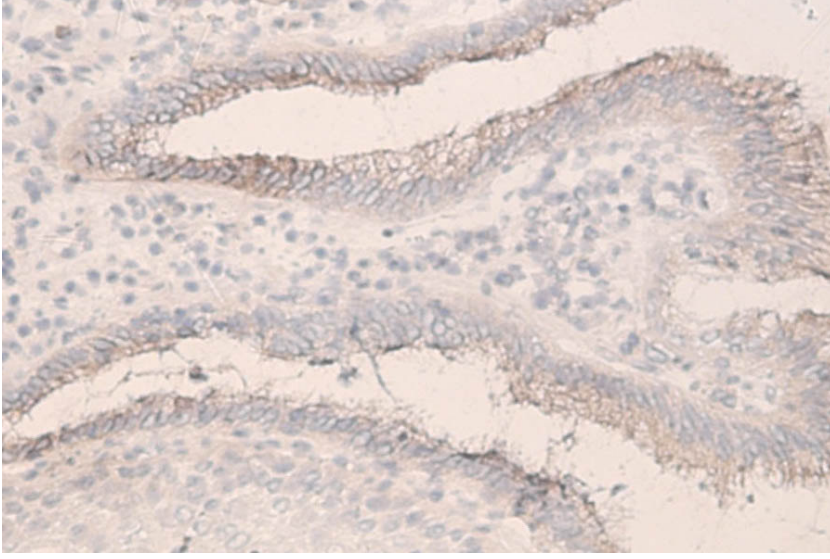
Resim 6: Aynı gruba ait diğer bir kesitin immünofloresan fotomikrografında kladin 1 ekspresyonu izlenmektedir. Ara poligonal tabakada bazal tabakada güçlü immünoaktivite gözlenirken bazal tabakada ekspresyon izlenmemektedir. FITC işaretli indirekt immünoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.



Resim 7: İmmünofloresan mikrografta, RE grubuna ait bir olgunun yüzey epitelinde anti-klaudin-2 ile reaktivitenin olmadığı görülmektedir. FITC işaretli indirekt immunoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.



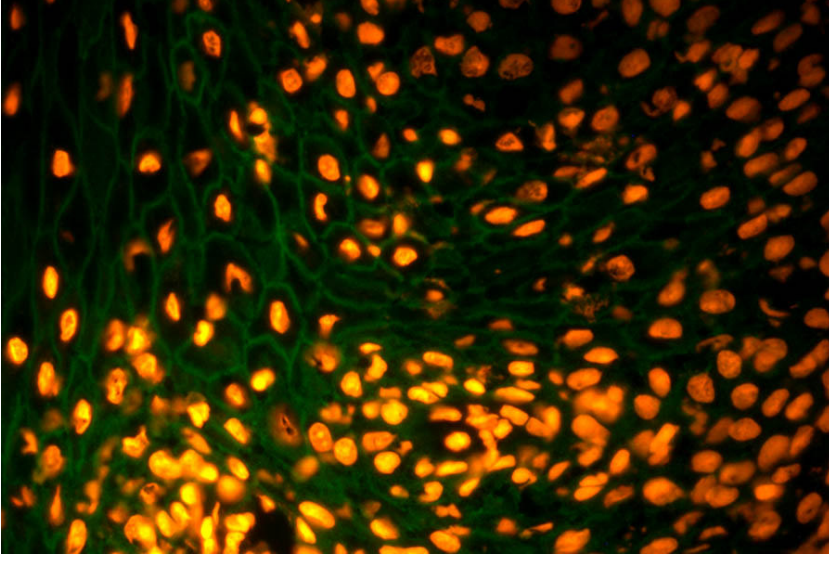
Resim 8: RE grubuna ait bir kesitte epitel bazal membranında (ok) zayıf şiddette bir kludin-2 ekspresyonunun varlığı izlenmektedir. Reaksiyonun lamina propriada yerleşik bezlerde de olduğu görülmektedir. *: kardia bezleri, e: epitel. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.



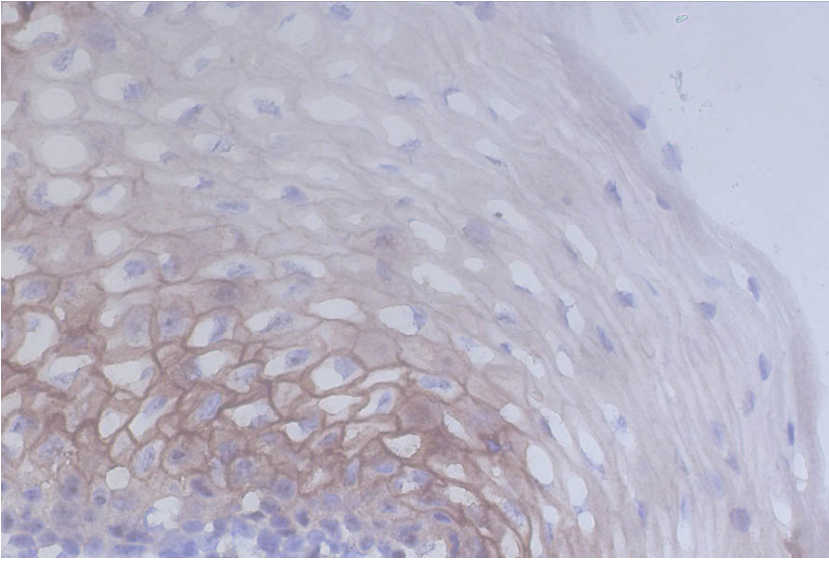
Resim 9: Aynı olguya ait kesitte komşu mide epitelindeki kludin-2 ekspresyonu izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.

4.6.2. Reflü özofajit tedavi sonrası

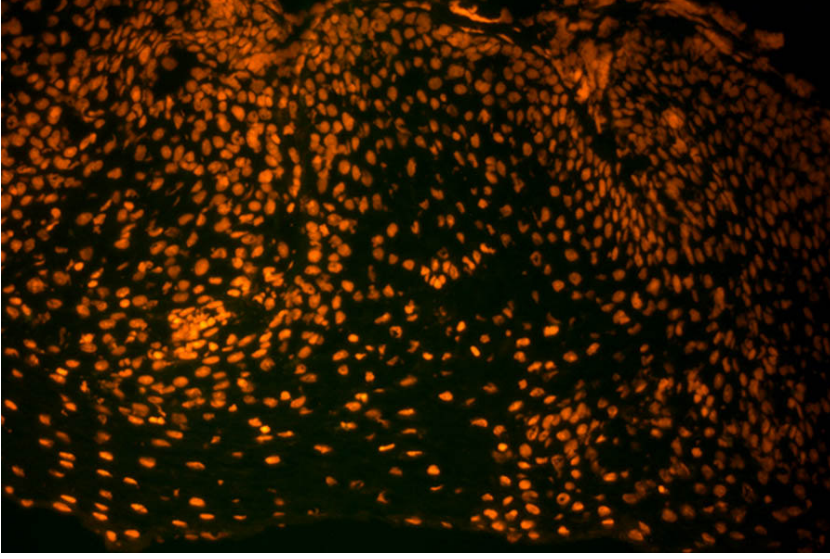
Altı haftalık tedavi alan RE olgularında özofagus epitelinde 1. grup için yukarıda tanımlanan kludin-1 ekspresyonunda genel bir azalma mevcuttu (Resim 10, 11). Altı haftalık tedavi sonrasında kludin-2 ekspresyonunda gerek dağılım gerekse reaksiyon şiddeti yönünden bir değişiklik dikkati çekmedi (Resim 12, 13). Reaksiyonun başlıca lamina propriada yerleşik bezlerin apikalinde olduğu saptandı. Benzer biçimde epitel bazal membranında bu yapıyla sınırlı zayıf şiddette bir reaksiyonun varlığı izlendi (Resim 13, 14).



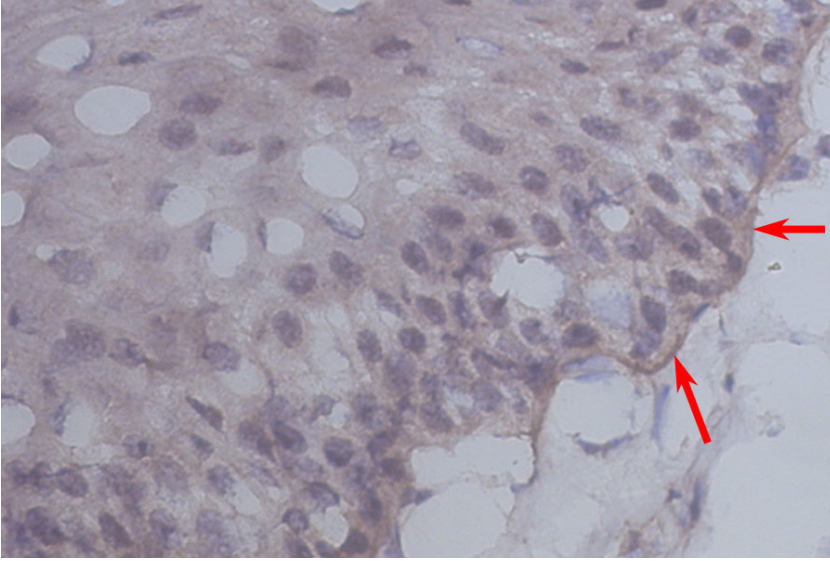
Resim 10: Tedavi sonrası reflü özofajit grubuna ait bir olgunun kesitinde klaudin-1 reaktivitesi izlenmektedir. Reaksiyonun ara poligonal tabakadaki hücrelerin zarlarında daha sınırlı olarak bulunduğu görülmektedir. FITC işaretli indirekt immunoflüoresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X40.



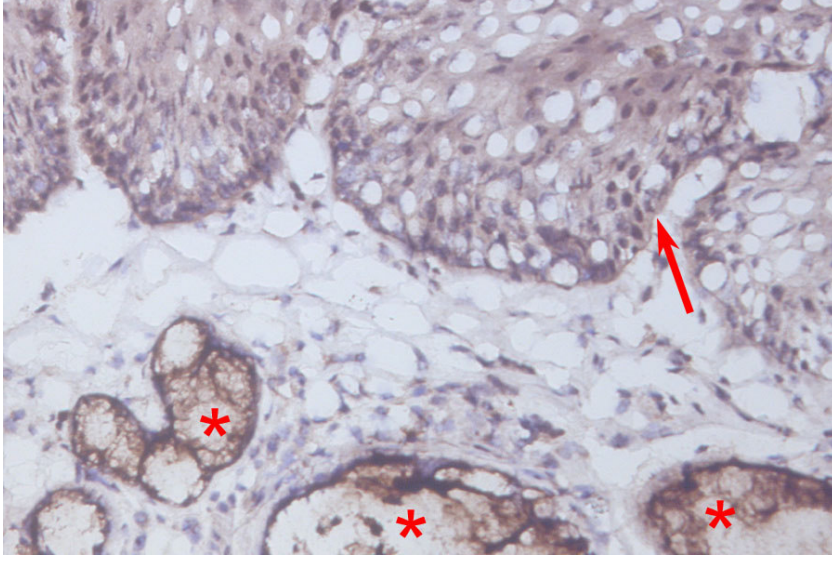
Resim 11: Aynı gruba ait diğer bir olgunun immünoperoksidaz yöntemiyle klaudin-1 reaktivitesinin görüldüğü mikrografta ekspresyonun daha derin yerleşimli ara poligonal tabaka hücrelerindeki varlığı izlenmektedir. Reaksiyon şiddeti yüzeysel katlara gittikçe azalmakta ve ortadan kalkmaktadır. İndirekt immünoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X40.



Resim 12: Klaudin-2 için yapılmış immünofloresan işaretlemeye 2. gruba ait bir olgunun yüzey epitelini içeren kesitinde herhangi bir reaksiyonun bulunmadığı izlenmektedir. FITC işaretli indirekt immünofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.



Resim 13: Aynı gruba ait bir diğer kesitte klaudin-2 ile bazal membrana lokalize sınırlı bir reaksiyonun varlığı görülmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X40.



Resim 14: Aynı gruptan başka bir kesitte lamina propriadaki kardial bezlerdeki kladin-2 immünoaktivitesi izlenmektedir. Epitel bazal membranında da zayıf/ orta derecede immünoaktivite mevcuttur. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.

4.6.3. Erozi olmayan Reflü hastalığı grubu tedavi öncesi

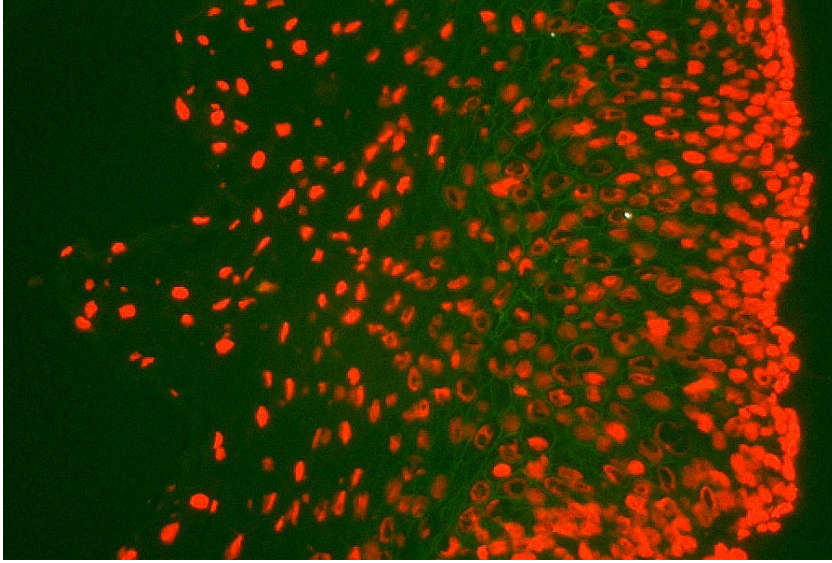
Bu gruba ait olgular incelendiğinde kladin-1 ekspresyonunun hücrelerin plazma membranında ve bazı olgularda plazma membranına komşu sitoplazmada bulunduğu görüldü. Ancak gruplara ait olguların tümü karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde bu gruptan elde edilen kesitlerde kladin-1 ekspresyonunun, 1. gruptan daha zayıf olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da en güçlü reaksiyon ara poligon tabakalarda izlendi (Resim 5, 6, 15, 16).

Her iki grup, bazal tabakadaki reaksiyon görülen olgu sayısı yönünden karşılaştırıldığında, reaksiyon bu grupta çalışılan 7 olgunun 3'ünde izlenip 4'ünde izlenmezken, 1. gruptaki (reflü özofajit) olguların hemen tümünde saptandı. Her iki grupta da immünofloresan yöntemle yapılan destekleme çalışmalarında bazal tabakadaki reaksiyon belirgin değildi.

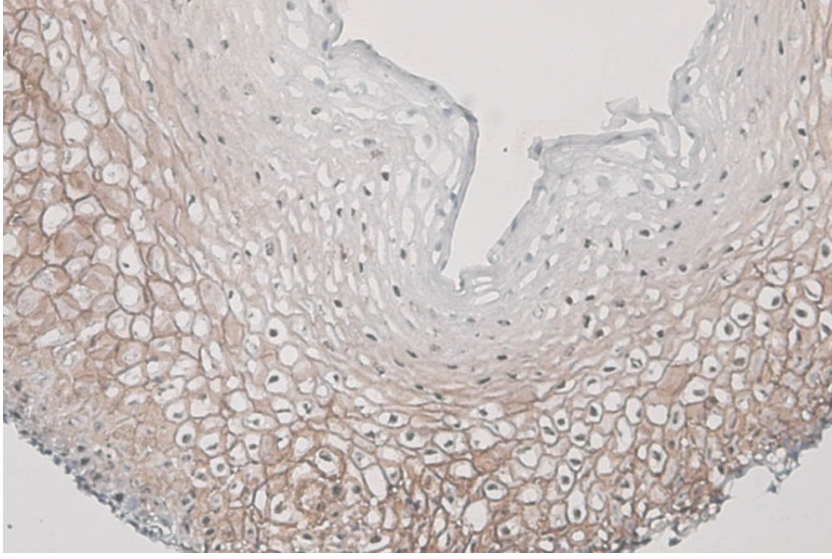
Bu gruba ait olguların hiçbirinde epitelin yüzeyel tabakasında bir reaksiyonun varlığı izlenmedi. Epitel yüzeyindeki reaksiyon yönünden her iki grup karşılaştırıldığında 1. grupta bazı olgulardaki zayıf reaksiyon dışında belirgin bir fark saptanmadı.

Aynı grubun kladin-2 için yapılan incelemelerinde, reflü özofajit grubunda olduğu gibi özofagus epitelinde herhangi bir ekspresyon izlenmedi (Resim 17). Bu

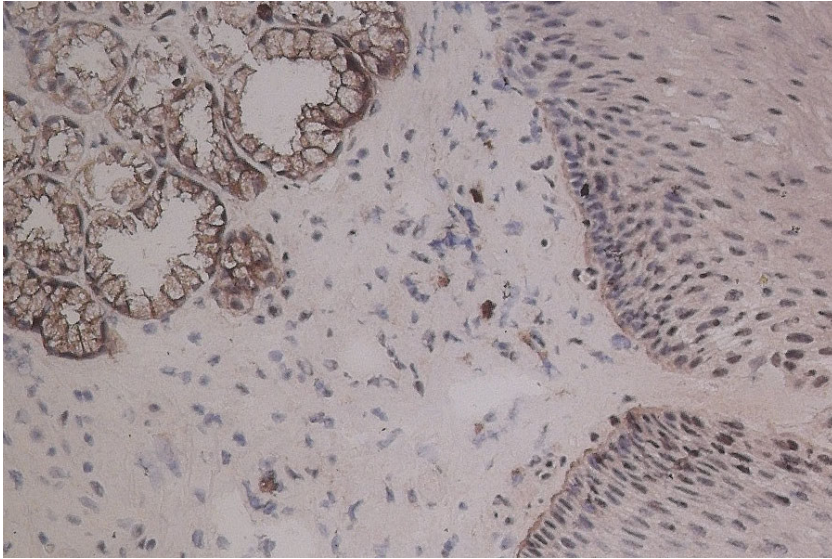
grupta da bazı olgularda epitelde ve özellikle bazal tabakadaki çekirdeklerde negatif kontrole kıyasla özgül olmayan zemin boyanması niteliğinde bir reaksiyonun varlığı görüldü. Epitel bazal membranında bu yapıyla sınırlı zayıf şiddetteki reaksiyon bazı olgularda bu grupta da mevcuttu (Resim 17) . Anti-klaudin 2 antikoru ile başlıca kardial bezlerde hücrelerin apikolateral kısımlarında ve/veya salgılarında zayıf reaktivite saptandı. Bazı olgularda kesitteki bezlerin bir kısmı reaktif iken bazı bezlerde ekspresyon gözlenmedi ya da daha az gözlendi. Bezlerin salgı ürünlerindeki reaksiyon non-spesifik olarak değerlendirildi (Resim 18, 19). Biyopsi alanlarında izlenen komşu mide yüzey ve bez epitelinde yukarıda tanımlanana benzer bir reaksiyonun olduğu görüldü.



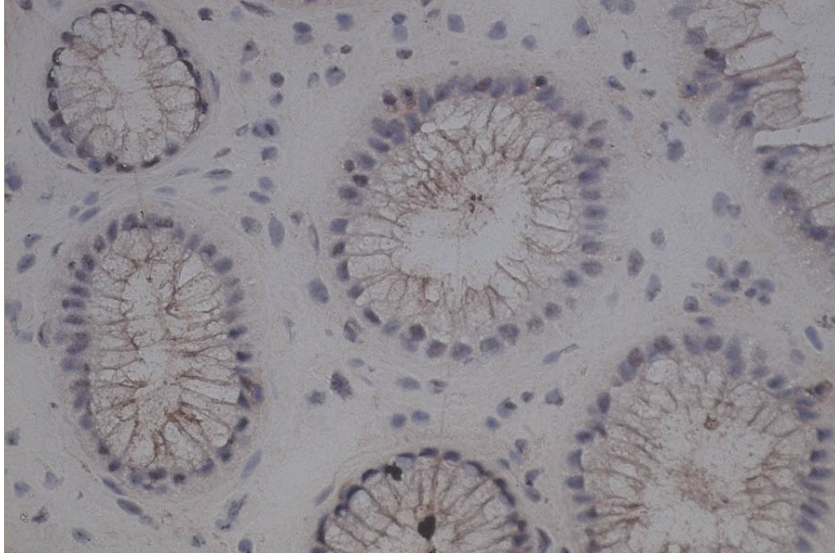
Resim 15: NERD grubundan bir olgunun kesitinde epiteldeki klauidin-1 reaksiyonu izlenmektedir. FITC işaretli indirekt immünoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.



Resim 16: Aynı olgunun immünoperoksidaz ile boyanmış kesitinde özofagus yüzey epitelinin kladin-1 ile orta şiddette reaktif olduğu izlenmektedir. Reaksiyon ara poligonal tabakada hücrelerin plazma membranında bulunmaktadır. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilin zemin boyaması, orijinal büyütme X20.



Resim 17: Üçüncü grubun kladin-2 antijeni için işaretlenmiş kesitinde bazal membrandaki immünoperoksidaz reaktivitesi izlenmektedir. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilin zemin boyaması, orijinal büyütme X40.



Resim 18: Üçüncü gruba ait bir kesitte lamina propriyadaki kardial bezlerdeki kladin-2 reaktivitesi görülmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyütme X40.

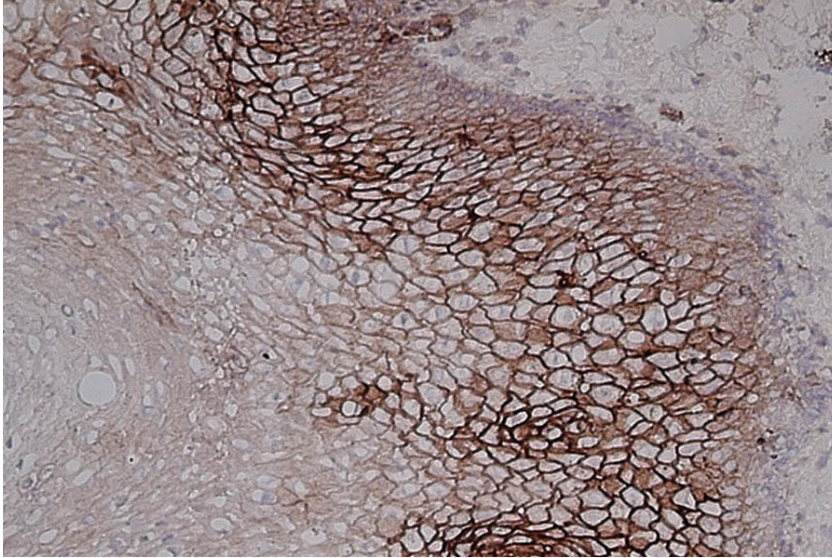


Resim 19: Aynı olgunun immünofloresan yöntemiyle yapılan işaretlemesinde bezlerdeki reaktivite görülmektedir. FITC işaretli indirekt immünofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X40.

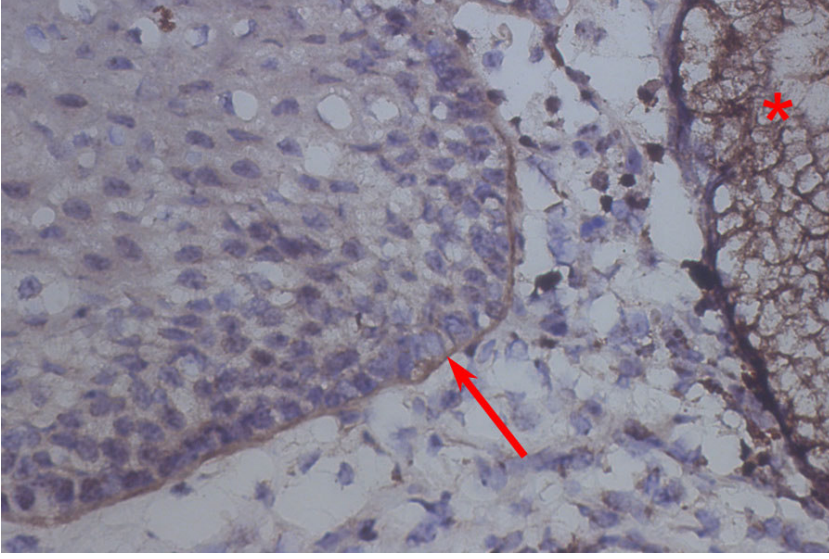
4.6.4. Eroziyon olmayan reflü hastalığı, tedavi sonrası

Altı haftalık tedavi alan NERD olgularının çoğunda 3. grup için yukarıda tanımlanan klaudin-1 ekspresyonunda hafif bir artış izlendi (Resim 20, Tablo 3 ve 4). Çalışmadaki tüm vakaların tedavi öncesi ve sonrası klaudin-1 ekspresyonları karşılaştırıldığında özofagus epitelindeki klaudin-1 reaktivitesinde azalma olan vaka sayısı biraz daha fazla bulundu (Tablo 1, 2, 3, 4).

NERD grubunda da RE vakalarda olduğu gibi 6 haftalık tedavi sonrasında klaudin-2 ekspresyonunda gerek dağılım gerek reaksiyon şiddeti yönünden bir değişiklik dikkati çekmedi. Reaksiyonun başlıca lamina propriada yerleşik bezlerin apikalinde olduğu saptandı. Benzer biçimde epitel bazal membranında bu yapıyla sınırlı zayıf şiddette bir reaksiyonun varlığı izlendi (Resim 21).



Resim 20: Tedavi sonrası NERD grubundan bir olgunun özofagus epitelindeki klaudin-1 reaktivitesi izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X 20.



Resim 21: Dördüncü gruptan bir başka olguda epitel bazal membranında ve komşu bağ dokusundaki kardial bezlerde kladin-2 reaksiyonunun varlığı büyük büyütme ile izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyütme X 40.

Gruplara ait tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırmalı immunohistokimyasal değerlendirmeler, Tablo-6, 7, 8 ve 9' da sunulmuştur:

Reflü özofajit grubu (Grup-1)

OLGU	BAZAL KAT	ARA POLİGONAL TABAKA	YÜZEYEL TABAKA
1	++	+++	-/+
2	+++	++++	+
3	+++	+++ /++++	-/+
4	++	++++	-
5	-/+	+++ /++++	-/+
6	+++	++++	+

Tablo-6: RE grubunda özofagus epitelindeki kladin-1 ekspresyonu

Reflü Özofajit, tedavi sonrası (Grup 2)

OLGU	BAZAL KAT	ARA POLİGONAL TABAKA	YÜZEYEL TABAKA
1	+	++	-
2	/	/	/
3	-/+	+++ /++++	-/+
4	+	++	-/+
5	/	/	/
6	+	++++	-

Tablo-7: RE grubunda tedavi sonrası özofagus epitelindeki kladin-1 ekspresyonu (/ : çalışılmadı)

Erozif Olmayan Reflü Hastalığı (Grup-3)

OLGU	BAZAL KAT	ARA POLİGONAL TABAKA	YÜZEYEL TABAKA
1	-	+ / ++	-
2	-	++	- / +
3	-	++ / +++	-
4	-	+	-
5	++	+++ / ++++	-
6	++	++	-
7	+	+++	-

Tablo-8: NERD' de özofagus epitelindeki kludin-1 ekspresyonu

Erozif Olmayan Reflü Hastalığı, tedavi sonrası (Grup 4)

	BAZAL KAT	ARA POLİGONAL TABAKA	YÜZEYEL TABAKA
1	-	+++	-
2	+	+++	- / +
3	++	+++	+
4	/	/	/
5	/	/	/
6	++	+++	-
7	- / +	++	-

Tablo-9: NERD' de tedavi sonrası özofagus epitelindeki kludin-1 ekspresyonu (/ : çalışılmadı)

5. TARTIŞMA

GÖRH patogenezinde en önemli faktörler antireflü bariyer ve luminal asit temizlenmesindeki bozukluklardır. Ancak hastaların bir kısmında bu faktörler olmadan da tipik reflü semptomları ortaya çıkabilmektedir. Bu hastalarda azalmış doku direnci patogenezde önemli rol oynamaktadır (66). Doku direnci temelde pre-epitelyal alanda, sıkı bağlantılar tarafından belirlenmekte olup; sıkı bağlantıların yapısal ve işlevsel olarak en önemli bileşenleri klaudin ailesine üye proteinlerdir (56).

Farklı organlardaki epitel dokularında, hatta aynı organın değişik kısımlarındaki hücreler arası sıkı bağlantılarda, klaudin proteinlerinin farklı kombinasyonlarda ve oranlarda olabildikleri bilinmektedir. Her bir çift sıkı bağlantı ipliğinde klaudinlerin çeşitli kombinasyonlarda ve oranlarda bir araya gelmesinin, sıkı bağlantıların sıklığını ve selektivitesini belirlediği yönünde kanıtlar vardır (67). Köpek böbreğinde yapılan çalışmalarda klaudin-2' nin eklenmesiyle sıkı bağlantı ipliklerinin sıklığının azaldığı ve klaudin-2' nin klaudin-1 ve/veya klaudin-4 ile birlikte parasellüler kanalları oluşturduğu gösterilmiştir (68). Klaudinin ekspresyon paterninin parasellüler geçirgenlik özelliğinin temelini oluşturduğu bildirilmiştir (69). Sıkı bağlantıların kompozisyonundaki farklılıkların iyon permeabilitesindeki farklılıklarla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (68,70). Böbrekte her bir nefronda hatta segmentteki sıkı bağlantı proteinlerindeki farklılıkların iyon geçirgenliğindeki farklılıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (71). Başka bir çalışmada böbrek proksimal tübüllerinde klaudin-2 ekspresyonunun artmış permeabiliteyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (72). Klaudinler sıkı bağlantıların ana yapısal bileşenleri olup hücre-hücre adhezyonu, hücre polaritesi ve parasellüler iyon transportundan sorumludurlar (73-75).

Sıkı bağlantıların, birçok hastalıkla özellikle de malin hastalıklarla ilişkisi ortaya konulmuştur. Karsinogenez sırasında birçok karsinom tipinde klaudin ekspresyonunda değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Gelecekte tümörlerin tedavisinde klaudinlerin adjuvan kemoterapi için hedef olabileceği düşünülmektedir. Yine birçok çalışmada sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonlarında değişiklik ile benin hastalıklar arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (55). Enteroparajenik *Escherichia coli* enfeksiyonu (76), primer biliyer siroz ve primer sklerozan kolanjit (77), kollajenöz colitis (78) gibi. Bariyer fonksiyonunda bozulmanın bakteriyel gastrit, psödomembranöz enterokolit, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, çölyak hastalığı,

kollajenöz kolit gibi gastrointestinal; sarılık, primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit gibi karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Astım hastalığında patogenezele ilgili olarak, allerjenlerdeki çeşitli peptidazların, klaudinler/okludinlerin hücre dışındaki parçalarını ayırıp sıkı bağlantı bariyerini zayıflattığı öne sürülmüştür (79,80). Diğer organlarla ilgili olarak multipl sklerozis, diyabetik retinopati, astım, kistik fibrosis, ovarian hiperstimulasyon sendromu gibi hastalıklar örnek olarak verilebilir (55).

Özofagus hastalıklarında sıkı bağlantı proteinleriyle ilgili literatürde az sayıda çalışma mevcuttur. Yapılmış olan araştırmaların çoğu da özofagus kanseriyle ilgili olup, iki çalışmada da Barrett metaplazisiyle ilişkisi araştırılmıştır. İngilizce literatürde GÖRH ile sıkı bağlantıların ilişkisini araştıran sadece bir hayvan deneyi mevcuttur. Bu çalışmaların sonuçlarına göre; klaudin-1 normal özofagusta bol miktarda bulunmaktadır; BM olan hastalarda ise ekspresyonunun azaldığı, Western blot analizinde kantitatif normalin % 32' sine ulaştığı bildirilmiştir (81). Klaudin-2 ise normal özofagus epitelinde saptanamamıştır, BM olan hastalarda ise düşük-orta dereceli olarak eksprese edildiği bulunmuştur (81). Ratlarda yapılan çalışmalarda özofagusta klaudin-1, 3 ve 4 saptanmış ancak klaudin-2 saptanamamıştır (82). Kontrol grubu olan ratlarla karşılaştırıldığında reflü özofajiti olan ratlardan alınan biyopsilerde erozyonların 1 mm uzağında bile klaudin-1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Yine kontrol grubuna göre klaudin-4' te hücre zarından sitoplazmaya doğru yer değiştirme ve klaudin-3 ekspresyonunda ise azalma bulunmuştur. Aynı çalışmada klaudin-1' deki artış ve klaudin-3' deki azalma Western blot yöntemiyle kantitatif olarak da saptanmıştır.

2006 yılında yayınlanmış olan bir çalışmada BM olan hastalarda, sükrözla transepitelyal kaçak miktarı çalışılmış ve sağlıklı kontrol grubu ve reflü hastalarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, klaudinlerin permeabiliteyle ilişkisini ortaya koyacak şekilde; sükröz transepitelyal kaçığının Barrett grubunda 3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Barrett özofagusunda klaudin- 1 ve 5' te azalma saptanırken klaudin-2 ve 3' ün ekspresyonunda artış olduğu bildirilmiştir (83).

Bizim bilgilerimize göre, yabancı dilde literatür incelendiğinde, çalışmamız reflü özofajitiyle ilgili insanlarda yapılmış ilk çalışmadır. Ayrıca NERD ve RE gruplarının karşılaştırılması; tedavi sonrası farkın değerlendirilmesi açısından da ilk olma özelliği taşımaktadır. Asaoka ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada reflü özofajitinde normal özofagus mukozası ile kıyasla klaudin-1 ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımızda da benzer şekilde her iki GÖRH grubunda

da immonohistokimyasal olarak belirgin şekilde klaudin-1 ile boyanma saptandı. Ek olarak daha fazla asit temasının ve daha belirgin epitelyal zedelenmeyi temsil eden RE grubunda daha belirgin boyanma olduğu tespit edildi.

Sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler ile reflü özofajiti arasındaki ilişki birkaç hipotezle açıklanabilir. Bunlardan ilki özofagus sıkı bağlantı proteinlerinde ortaya çıkan değişikliğin, sıkı bağlantı proteinlerinin iyon geçirgenliğindeki rolü göz önüne alındığında, asit geçirgenliğini arttırarak özofajit gelişimini kolaylaştırdığı şeklindedir. GÖRH' de izlenen özofajit, asit materyalin epitelde yol açtığı hasar ile oluşmaktadır. Epitelyal zedelenmede asitin parasellüler aralığa geçişi çok önemlidir. Hatta bu geçiş sonrası asitin serbest sinir uçlarına ulaşmasının ağrının ortaya çıkmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (84,85). Klaudin-1 ekspresyonundaki artışın özofagus epitelinde hücreler arasındaki sıkı bağlantıların kompozisyonunu değiştirerek bariyer işlevinin zayıflamasına, dolayısıyla da çok katlı yassı epitelin geçirgenliğinin artmasına sebep olduğu düşünülebilir. Klaudin-1 HCl' nin geçişini sağlayan parasellüler kanalların yapısına doğrudan katılıyor da olabilir. Çalışmamızın sonucunda daha fazla özofagus harabiyetini temsil eden erozif GÖRH grubunda klaudin-1 ekspresyonunda erozif olmayan gruba göre artma saptanmış olması, ekspresyon artışının asit geçirgenliğini daha fazla arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Diğer taraftan klaudin-1 ekspresyonundaki bu değişiklik, epitelyal zedelenmenin nedeni değil, sonucu olabileceği üzerine de olabilir. Özofagus epiteli asit/pepsin ile zedelendiğinde bir adaptasyon veya savunma mekanizması olarak sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda değişikliğe yol açmış olabilir. Bir çalışmada sıçan kronik özofajit modelinde, sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin artış gösterdiği gösterilmiştir (86). Salgılanan sitokinler sıkı bağlantı proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunda değişikliğe yol açıyor olabilir.

Asıl zedeleyici etkenler olan asit ve pepsin ilk olarak özofagus epitelindeki intersellüler bağlantılarda hasara yol açmaktadır (32). NERD hastalarında önceleri elektron mikroskobu ile değerlendirilen hücrelerarası boşlukta genişleme tanımlanmıştır (87,88, 84). Takiben bu bulgunun, hematoksilen-eozin boyalı preparatlarda ışık mikroskobunda da değerlendirilebileceği ve reflü hastalığının değerli bir belirteci olduğu bildirilmiştir (89). Tavşanlarla yapılan hayvan çalışmalarında bu genişlemenin özofagus potansiyel farkında ve elektriksel dirençte azalma, mannitol geçirgenliğinde ise artışla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu bulgular

hücrelerarası boşluktaki genişlemenin, asitle zedelenmiş özofagus epitelinde artmış parasellüler geçirgenliği yansıttığı ileri sürülmüştür. Artmış parasellüler permeabilitenin bu genişlemenin asıl nedeni olduğu, bu artışın ise epitel hücre zarının zedelenmesi ve bozulmuş sodyum taşınmasıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir (90,91). İntersellüler aralıklardaki genişleme defektif epitelyal bariyer fonksiyonunun bir göstergesi olup hastalığın yakınma ve bulgularını da açıklayabilir. İntersellüler aralıklardaki duyarlı sinir uçlarının etkilenmesiyle pirozis gibi yakınmaların ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (92). Pirozis hissi doğrudan sinir uçlarının asitle teması sonucu oluşmakta, bu temasın gerçekleşmesi için de epitelyal bariyerde bir defektin olması gereklidir.

Özofagus epitelindeki intersellüler aralıklardaki genişlemenin nedeni bilinmemektedir. Sıkı bağlantı proteinlerinin özellikle de klaudinlerin epitelyal hücreleri çit şeklinde çevrelemesi, epitel hücrelerinin adhezyonu ve polaritesini sağlama işlevleri mevcut olduğu bilinmektedir. Bu işlevleri göz önüne alınırsa, intersellüler aralıklardaki genişleme ile klaudinler arasında bir ilişki olabilir. Klaudinlerin asitle zedelenmesi sonucu işlevlerinin azalması, epitel hücrelerini, daha gevşek olarak birarada tutmalarına ve bu da intersellüler aralıklarda genişlemeye neden olabilir. Hücre adhezyon molekülleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, işlevlerinin kaybının hücre adhezyonunun bozulmasıyla sonuçlandığı saptanmıştır. Epitelyal hücrelerdeki adhezyon moleküllerinden biri olan e-kadherinlerin inhibisyonunun epitelyal hücrelerde adhezyonun ve hücre invazyonunun bozulmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (93). Klaudin ekspresyonuyla intersellüler aralıklarda genişleme ilişkisinin ortaya araştırılması için geniş çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bir diğer sonuç tedavi sonrası dönemde erozif grupta tedavi sonrası klaudin-1 ekspresyonunda hafif bir azalma olduğu şeklindeydi. Erozif olmayan grupta ise anlamlı bir azalma saptanmamış idik. Eğer her iki grupta tedavi sonrasında azalma saptanmış olsaydı klaudinlerle doku hasarı arasında nedensel bir ilişki daha kuvvetle düşünülebilirdi. Bu konuda başka veri olmadığından, asit supresyonunun klaudin-1 ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için başka çalışmaların yapılması gereklidir. Öte yandan erozif grupta tedavi sonrasında izlenen azalma, eğer daha geniş çalışmalarda doğrulanırsa hastalığın patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunabilir; hatta gelecekte doku direncinin düzeltilmesine yönelik yeni tedavi hedefleri belirlenebilir. Haelen PPI' ler ile azalan özofagus doku direncinin düzelişip düzelmediği açıklanmayı bekleyen bir konudur.

Sıçan kronik asit reflü özofajit modelinde yapılan bir çalışmada, erozyondan 1mm mesafedeki normal görünümlü mukozada dahi klaudin ekspresyonlarında değişiklik saptanmıştır (82). Yine sıkı bağlantı proteinlerindeki moleküler değişikliklerin histolojik olarak saptanabilen displazinin başlangıcından daha önce geliştiği antral displazili hayvan model çalışmaları ile öne sürülmüştür (81). Erken moleküler değişiklikler epitelin fonksiyonel permeabilitesindeki değişikliğin temelini oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışmalardan da anlaşıldığı üzere endoskopik görüntü ile mikroskopik histolojik bulgu arasında her zaman uyum olmayabilir, yani endoskopik olarak saptanabilir erozyon gelişmeden daha önce klaudin ekspresyonları değişebilir. Çalışmamızda bazı NERD vakalarındaki ekspresyon paterninin erozif özofajitte gözlenen ekspresyona benzemesi bu bilgiler ışığında açıklanabilir. Endoskopik olarak erozif olmayan GÖRH ile hafif deRecede erozyonlarla giden GÖRH' yi birbirinden ayırt etmek güç olup, gözlemciye bağlı değişkenlikler gösterilebilir. Yapılacak daha ileri çalışmalarla klaudin ekspresyonundaki değişiklikler detaylı olarak ortaya konabilirse, RE, NERD, BM veya displazi olan GÖRH olguları histopatolojik olarak belirlenebilir. Böylece hastaların daha sağlıklı takibi, riskli hastaların belirlenmesi mümkün olabilir.

Çalışmamızda her iki grupta özofagus yüzey epitelinde klaudin-2 ile boyanma tespit edilmedi. Rendon-Huerta ve arkadaşlarının çalışmasında normal özofagus mukozasında klaudin-2 bulunmaz iken Barrett metaplazisi olan hastalarda düşük-orta deReceli boyanma olduğu rapor edilmişti. Yine Asaoka ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışmada benzer sonuç bildirilmişti. Bizim çalışmamızda da klaudin-2 ile ilgili sonuçlar literatür ile uyumlu sonuçlanmıştır.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonunda amaçladığımız hedeflere önemli ölçüde ulaşmış olduk. Yaptığımız çalışmalarda sıkı bağlantı proteinlerinin distal özofagusta belirgin şekilde eksprese edildiğini ortaya koyduk. Literatür ile uyumlu olarak bariz şekilde klaudin-1 eksprese edilirken, klaudin-2' nin özofagus yüzey epitelinde eksprese edilmediğini gördük.

Klaudin-1 ekspresyonu tüm GÖRH grubunda saptanabilir durumdaydı. Göreceli olarak daha yoğun epitelyal hasarını temsil eden erozif GÖRH grubunda, erozif olmayan GÖRH hastalarına göre daha belirgin eksprese edilmekteydi. Klaudinlerin daha önce yapılan çalışmalarda kronik reflü özofajit ile ilişkisi ortaya konmuş, bunun klaudin ekspresyonunda değişikliğe paralel olarak değişen geçirgenlik farkına bağlı olabileceği ileri sürülmüş idi. Bu doğrultuda biz de klaudin-1 ekspresyonundaki artışın epiteldeki parasellüler geçirgenlikte artışa neden olduğunu, artmış asit penetrasyonunun da doku hasarına neden olduğunu düşündük. Erozif özofajit grubunda klaudin-1 ekspresyonunun daha fazla olması da bu hipotezi desteklemekteydi. Tedavi sonundaki yanıt değerlendirildiğinde erozif grupta klaudin-1 ekspresyonunda hafifçe bir azalma tespit edilirken, erozif olmayan grupta anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Aslında patofizyolojik mekanizmalar düşünüldüğünde her iki grupta da benzer bir sonuç elde edilmesi beklenirdi, bu durumda klaudin-1 ekspresyonundaki artışla hastalığın patogenezi arasında nedensel bir ilişki olabileceği düşünülebilirdi. Öte yandan bu farklılık olasılıkla hasta sayımızın az olmasıyla ilişkili bir durum olabilir. Buna rağmen erozif gruptaki hafif azalma asit baskılayıcı tedavi ile doku direncinin düzelebileceğinin dolaylı bir bulgusu olabilir. Gelecekte GÖRH' da tedavisinde amaçlarımızdan biri, semptomların kontrolü ve doku zedelenmesinin önüne geçilemesi yanında doku direncinin düzeltilmesi olabilir. Bunun ortaya konulabilmesi için ileride daha geniş çalışmaların yapılması gerekli olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R; Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol.* 2006 Aug;101(8):1900-20
- 2- Orlando RC. Reflux esophagitis. In: Yamada T, Alpers . DH, Laine L, Owyang C, Powell DW, editors. *Textbook of gastroenterology.* Philadelphia: LiPPincott Williams & Wilkins; 1999. p. 1235-1263
- 3- Hampel, H, Abraham, NS, El-Serag, HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143:199
- 4- Hunt, RH. Importance of pH control in the management of GERD. *Arch Intern Med* 1999; 159:649
- 5- Kahrilas, PJ, Fennerty, MB, Joelsson, B. High-versus standard-dose ranitidine for control of heartburn in poorly responsive acid reflux disease: A prospective, controlled trial. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:92
- 6- DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:1434–1442
- 7- Castell DO, Richter JE, Robinson M, et al. Efficacy and safety of lansoprazole in the treatment of erosive reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol.* 1996;91:1749–1757
- 8- Mossner J, Holscher AH, Herz R, Schneiders A. A double-blind study of pantoprazole and omeprazole in the treatment of Reflux oesophagitis: a multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther.*1995;9:321–326
- 9- Vigneri S, Termini R, Leandor G, et al. A comparison of five maintenance therapies for reflux esophagitis. *N Engl J Med.* 1995;333:1106–1110
- 10- Hatlebakk JG, Katz PO, Kuo B, Castell DO. Nocturnal gastric acidity and acid breakthrough on different regimens of omeprazole 40 mg daily. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12:1235–1240
- 11- Chiba, N, De Gara, CJ, Wilkinson, JM, et al. Speed of healing and symptom relief in grade II to IV gastroesophageal reflux disease: A meta-analysis. *Gastroenterology* 1997; 112:1798
- 12- Hetzel, DJ, Dent, J, REed, WD, et al. Healing and relapse of severe peptic esophagitis after treatment with omeprazole. *Gastroenterology* 1988; 95:903
- 13- Bardhan, KD, Muller-Lissner, S, Gibard, MA, et al. Symptomatic gastroesophageal reflux disease: Double blind controlled study of intermittent treatment with omeprazole or ranitidine. *BMJ* 1999; 318:502
- 14- FREston, JW. Omeprazole, hypergastrinemia, and gastric carcinoid tumors. *Ann Intern Med* 1994; 121:232

- 15- Klinkenberg-Knol, EC, Nelis, F, Dent, J. Long-term omeprazole treatment in resistant gastroesophageal Reflux disease: Efficacy, safety, and influence on gastric mucosa. *Gastroenterology* 2000; 118:661
- 16- El-Nujumi, A, Williams, C, Ardill, JE, et al. Eradicating *Helicobacter pylori* reduces hypergastrinemia during long term omeprazole treatment. *Gut* 1998; 42:159
- 17- Lundell, L, Miettinen, P, Myrvold, HE, et al. Lack of effect of acid suppression therapy on gastric atrophy. *Gastroenterology* 1999; 117:319
- 18- Pace, F, Porro, GB. Gastroesophageal reflux disease: a typical spectrum disease (a new conceptual framework is not needed). *Am J Gastroenterol* 2004; 99:946
- 19- Sampliner R, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 1998;93:1028–1032
- 20- Galmiche, JP, Scarpignato, C. Esophageal pH monitoring. In: *Functional Evaluation in Esophageal Disease*, Scarpignato, C, Galmiche, JP (Eds), *Front Gastrointest Res* 1994; 22:71
- 21- DeVault, KR, Castell, DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:190
- 22- DeVault, KR, Castell, DO. Guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Arch Intern Med* 1995; 155:2165
- 23- Sellar, RJ, De Caestecker, JS, Heading, RC. Barium radiology: A sensitive test for gastro-esophageal reflux. *Clin Radiol* 1987; 38:303
- 24- Numans, ME, Lau, J, de Wit, NJ, Bonis, PA. Short-term treatment with proton-pump inhibitors as a test for gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis of diagnostic test characteristics. *Ann Intern Med* 2004; 140:518
- 25- Tobey NA, Hosseini S, Caymaz-Bor C, Wyatt HR, Orlando GS, Orlando RC. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3062–70
- 26- Gotley DC, Morgan AP, Ball D, Owen RW, Cooper MJ. Composition of gastroesophageal refluxate. *Gut* 1991;32:1093–9
- 27- Robertson D, Aldersley M, Shepherd H, et al. Patterns of acid reflux in complicated oesophagitis. *Gut*. 1987;28:1484–1488
- 28- Bachir GS, Collis JL. Effect of perfusion of bile salts and controls. *Thorax*. 1976;31:271–277
- 29- Kelly WD, MacLean LD, Perry JF, et al. A study of patients following total and near-total gastrectomy. *Surgery*. 1964;35:964

- 30- Vela MF, Camacho-Lobato L, Srinivasan R, et al. Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. *Gastroenterology*. 2001;120:1599–1606
- 31- Hirschowitz BI. A critical analysis, with appropriate controls of gastric acid and pepsin secretion in clinical esophagitis. *Gastroenterology* 1991;101:1149–58
- 32- Kahrilas PJ, Shi G. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: the antireflux barrier and luminal clearance mechanisms. In: Orlando RC, editor. *Gastroesophageal reflux disease*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 137–64
- 33- Holloway RH. The anti-reflux barrier and mechanisms of gastro-oesophageal reflux. *Bailliere's Best Practice&Research Clin Gastroenterology* 14 (5): 681-699, 2000
- 34- Porro GB, Galmiche JP, Pace F. *Gastroesophageal reflux disease*. In: Porro GB edit. *Gastroenterology and hepatology*, 1st edn. London: McGraw-Hill: 111-127, 1999
- 35- Orlando RC. Overview of the mechanisms of gastroesophageal reflux. *Am J Med* 2001;111(Suppl 8A):174S-7S
- 36- Poudoux P, Verdier E, Kahrilas PJ. Patterns of esophageal inhibition during swallowing, pharyngeal stimulation, and transient LES relaxation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G242-7
- 37- Holloway, RH, Penagini, R, Ireland, AC. Criteria for objective definition of transient lower esophageal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 1995; 268:G128
- 38- Mittal RK, McCallum RW. Characteristics and frequency of transient relaxations of the lower esophageal sphincter in patients with reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 1988 Sep;95(3):593-9
- 39- Helm JF, Dodds WJ, Pelc LR, Palmer DW, Hogan WJ, Teeter BC. Effect of esophageal emptying and saliva on clearance of acid from esophagus. *N Engl J Med* 1984;310:284
- 40- Dods WJ, Dent J, Hogan WJ, Helm JF, Hauser R, Patel GK, et al. Mechanism of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. *N Engl J Med* 1982;307:1547-52
- 41- Sloan S, Kahrilas PJ. Impairment of esophageal emptying with hiatal hernia. *Gastroenterology* 1991;100:596-605
- 42- Orlando RC. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease: offensive factors and tissue resistance. In: Orlando RC, editor. *Gastroesophageal reflux disease*. New York: Marcel Ddekker; 2000.p. 165-92

- 43- Orlando RC. Reflux esophagitis. In: Yamada T, Alpers DH, Laine L, Owyang C, Powell DW, editors. Textbook of gastroenterology. Philadelphia: LiPPincott Williams & Wilkins;1999. p. 1235–63
- 44- Kahrilas PJ, Doods WJ, Hogan WJ, et al. Esophageal peristaltic dysfunction in peptic esophagitis. *Gastroenterology*. 1986;91:897–904
- 45- Fouad YM, Katz PO, Hatlebakk JG, Castell DO. Ineffective esophageal motility: the most common motility abnormality in patients with GERD-associated respiratory symptoms. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1464
- 46- Salo J, Kivilaakso E. Role of luminal Hp in the pathogenesis of experimental esophagitis. *Surgery* 1982;92:61–8 & Bernstein LM, Baker LA. A clinical test for esophagitis. *Gastroenterology* 1958;34:760–81
- 47- Quigley EM, Turnberg LA. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. Studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. *Gastroenterology*. 1987 Jun;92(6):1876-84
- 48- Orlando RC. Why is the high grade inhibition of gastric acid secretion afforded by proton pump inhibitors often required for healing of reflux esophagitis? An epithelial perspective. *Am J Gastroenterol*. 1996 Sep;91(9):1692-6
- 49- Orlando RC, Lacy ER, Tobey NA, Cowart K. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1992;102:910–23
- 50- Tobey NA, Argote CM, Hosseini SS, Orlando RC. Calcium-switch technique and junctional permeability in native rabbit esophageal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Jun;286(6):G1042-9. Epub 2004 Jan 22
- 51- Christie KN, Thomas C, Xue L, Lucocq JM, Hopwood D. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium. *J Histochem Cytochem* 1997;45:35–40
- 52- Tobey NA, Reddy SP, Khalbuss WE, Silvers SM, Cragoe EJ Jr, Orlando RC. Na-dependent and -independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in cultured rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology* 1993;104:185–95
- 53- Castell DO, Murray JA, Tutuian R, Orlando RC, Arnold R. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease - oesophageal manifestations. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Dec;20 Suppl 9:14-25
- 54- Anderson JM: Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 2001, 16:126-130 &&& Tsukita Sh, Furuse M, Itoh M: Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:285-293
- 55- Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003 Sep;36(3):147-56

- 56- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita Sh: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998, 141:1539-1550
- 57- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita Sh: Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002, 156:1099-1111
- 58- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788
- 59- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391-401
- 60- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397-408
- 61- Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, du Pasquier L, Imhof BA (2001) Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98:3699-3707
- 62- Hirata Ki, Ishida T, Penta K, REzaee M, Yang E, Wohlgemuth J, Quertermous T (2001) Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 276:16223-16231
- 63- O'Connor HJ. Review article: *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal Reflux disease-clinical implications and management. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13:117-127
- 64- Weston AP, Badr AS, Topalovski M, et al. Prospective evaluation of the prevalence of gastric *Helicobacter pylori* infection in patients with GERD, Barrett's esophagus, Barrett's dysplasia, and Barrett's adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:387-394
- 65- el-Omar, EM, Penman, ID, Ardill, JE, et al. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 1995; 109:681
- 66- Orlando RC. Pathogenesis of reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Med Clin N Am* 89 (2005) 219-241
- 67- Tsukita Sh, Furuse M: Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000, 149:13-16

- 68- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S: Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing kladin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 2001, 153:263-272
- 69- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of kladins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 2001;120:411-22
- 70- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of kladin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 2001;107:1319-27
- 71- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of kladins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:875-86
- 72- Enck AH, Berger UV, Yu AS. Kladin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol RENal Physiol.* 2001 Nov;281(5):F966-74
- 73- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of interaction of heterogeneous kladin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147:891-903
- 74- Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S (2004) A peculiar internalization of kladins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 117:1247-1257
- 75- Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM (2001) Kladin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology* 121:678-684
- 76- Simonovic I, Rosenberg J, Koutsouris A, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occluding from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol* 2000;2:305-15
- 77- Sakisaka S, Kawaguchi T, Taniguchi E, Hanada S, Sasatomi K, Koga H et al. Alterations in tight junctions differ between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2001;33:1460-8
- 78- Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002;123:433-43
- 79- Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C: Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions *J Clin Invest* 1999, 104:123-133
- 80- Robinson C, Baker SF, Garrod DR: Peptidase allergens, occludin and kladins. Do their interactions facilitate the development of hypersensitivity reactions at mucosal surfaces? *Clin Exp Allergy* 2001, 31:186-192

- 81- Rendon-Huerta E, Valenzano MC, Mullin JM, Trembeth SE, Kothari R, Hameed B, Mercogliano G, Thornton JJ. Comparison of three integral tight junction barrier proteins in Barrett's epithelium versus normal esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol*. 2003 Aug;98(8):1901-3
- 82- Asaoka D, Miwa H, Hirai S, Ohkawa A, Kurosawa A, Kawabe M, Hojo M, Nagahara A, Minoo T, Ohkura R, Ohkusa T, Sato N. Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. *J Gastroenterol*. 2005 Aug;40(8):781-90
- 83- Mullin JM, Valenzano MC, Trembeth S, Allegretti PD, Verrecchio JJ, Schmidt JD, Jain V, Meddings JB, Mercogliano G, Thornton JJ. Transepithelial Leak in Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci*. 2006 Nov 14
- 84- Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS, Orlando RC. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol*. 2004 Jan;99(1):13-22
- 85- Rodrigo J, Hernandez CJ, Vidal MA, Pedrosa JA. Vegetative innervation of the esophagus. III. Intraepithelial endings. *Acta Anat (Basel)*. 1975;92(2):242-58
- 86- Hamaguchi M, Fujiwara Y, Takashima T, Hayakawa T, Sasaki E, Shiba M et al. Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion* 2003;68:189-97
- 87- Hopwood D, Milne G, Logan KR (1979) Electron microscopic changes in human oesophageal epithelium in oesophagitis. *J Pathol* 129:161-167
- 88- Tobey NA, Carlson JL, Alkiek RA, et al. Dilated intercellular spaces: A morphological feature of acid-reflux damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996;111:1200-5
- 89- Villanacci V, Grigolato PG, Cestari R, Missale G, Cengia G, Klersy C, Rindi G (2001) Dilated intercellular spaces as markers of reflux disease: histology, semiquantitative score and morphometry upon light microscopy. *Digestion* 64:1-8
- 90- Orlando RC, Bryson JC, Powell DW (1984) Mechanisms of H⁺-induced injury in rabbit esophageal epithelium. *Am J Physiol* 246:G718-G724
- 91- Tobey NA, Powell DW, Schreiner VJ, Orlando RC (1989) Serosal bicarbonate protects against acid injury to rabbit esophagus. *Gastroenterology* 96:1466-1477
- 92- Rodrigo J, Hernandez CJ, Vidal MA, Pedrosa JA. Vegetative innervation of the esophagus. III. Intraepithelial endings. *Acta Anat (Basel)* 1975; 92: 242-58
- 93- Veerle Noë, Jean Willems, Joël Vandekerckhove, Frans Van Roy, Erik Bruyneel and Marc Mareel. Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides. *Journal of Cell Science* 112, 127-135 (1999).