

Helicobacter pylori Enfeksiyonunda Malondialdehit ve Glutasyon Peroksidazm Mukoza Düzeyleri: Eradikasyonun Etkisi

THE MUCOSAL LEVELS OF MALONDIALDEHYDE AND GLUTATHION PEROXIDASE IN THE INFECTION OF HELICOBACTER PYLORI; EFFECT OF ERADICATION

İ. Halil BAHÇEÇİOĞLU*, Seval YILMAZ**, Bilal ÜSTÜNDAĞ***, Ayhan DOĞUKAN*. Azız KARAOĞLU****. Emir DÖNDER*****

* Yrd.Doç.Dr.,Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları,
** Dr.,Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Öğ. Gör.,
*** Yrd.Doç.Dr.,Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD.
**** İ.Z.Dr.Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları,
***** Doç.Dr.,Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi. İç Hastalıkları, ELAZIĞ

Özet

Helicobacter pylori enfeksiyonunun gastrik karsinogeneziste bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Fakat mekanizması açık değildir. Biz bu çalışmada gastrik kansere /uvdis/ozan olduğu düşünülen *Helicobacter pylori* gastritinde serbest oksijen radikallerinin rolünü tespit etmeyi amaçladık. Histopatolojik olarak aktif gastriti hastalarda malondialdehit ve glutasyon peroksidaz mukoza/ düzeylerini çalıştık; Eradikasyonun etkisini inceledik.

Helicobacter pylori gastritinde malondialdehit düzeyleri normal histolojiye göre anlamlı yüksekli ($p < 0.001$). (malondialdehit peroksidaz düzeyleri arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$). h'radikasyon tedavisiyle malondialdehit ve glutasyon peroksidaz düzeylerinde anlamlı azalma oldu ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

Bu sonuç *Helicobacter pylori*'nin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu arttırdığını göstermektedir. Bu gastrik karsinogeneziste önemli olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, Malondialdehit, Glutasyon peroksidaz, Eradikasyon

T Klin Gastroenterohepatoloji 1998, 9:65-69

Helicobacter pylori (H. pylori) peptik ülser ve antral tip B gastritin en önemli nedenidir. Aynı zamanda gastrik kanser gelişiminde de önemli risk

Geliş Tarihi: 15.10.1998

Yazışma Adresi: Dr.İ. Halil BAHÇEÇİOĞLU
Üniversite Mah. Zübeyde Hanım Gad.
No: 150.7. ELAZIĞ

T Klin .1 (gastroenterohepatoloji) 1998, 9

Summary

Helicobacter pylori infection is considered as a risk factor for gastric cancer, but the mechanism is unclear. In this study, we aimed to assess the role of oxygen radicals in the patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis, a condition which predisposes to gastric cancer. We studied mucosal levels of malondialdehyde and glutathion peroxidase in patients with histopathologically active gastritis and we investigated the effect of eradication.

The levels of malondialdehyde in the patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis were significantly higher compared with normal ($p < 0.001$). The level of glutathion peroxidase is not significantly different ($p > 0.05$). Eradication of *Helicobacter pylori* resulted in a significant reduction in the level malondialdehyde and glutathion peroxidase ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

These data suggest that *Helicobacter pylori* is playing a role in the generation of free oxygen radicals. The role of *Helicobacter pylori* may be important in gastric carcinogenesis.

Key Words: *Helicobacter pylori*, Malondialdehyde, Glutathion peroxidase, Eradication

T Klin .1 Gastroenterohepatol 1998, 9:65-69

faktörü olduğu kabul edilmektedir (1,2). H.pylori birinci grup karsinojenler arasında yer almaktadır (3). H. pylori pozitif bireylerde negatif olanlara göre gastrik kanser görülme sıklığının yaklaşık dört kat arttığı bildirilmektedir (4). Bakterinin gastrik kanser oluşumunda nasıl bir mekanizmayla etkili olduğu açık değildir. H. pylori enfeksiyonunun serbest oksijen radikallerinin oluşumunu arttırdığı

bildirilmektedir (5). Serbest oksijen radikalleri organizmada hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de zararlı etkenlerle oluşurlar. Hücre membranlarma zarar verirler ve DNA'da hasara yol açarlar. Hücre DRASmdaki bu zararlı etki, mutajenik ve karsinojenik olan gen modifikasyonu ile oluşmaktadır (4).

Toksik oksijen metabolitleri membran yağ asitlerinin oksidatif yıkımı ile lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Malondialdehit düzeyi lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (6-8). Organizmada reaktif oksijen metabolitleri ve lipid kökenli ara ürünleri detoksifiye eden koruyucu antioksidan sistemleri vardır. Bu sistemde yer alan önemli enzimler süper oksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır (9,10). Serbest radikallerin reaktif yapıları ve çok kısa ömürlü olmaları doğrudan tayinlerini güçleştirmektedir. Bu nedenle serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri ve savunma sistemlerinin incelenmesi tercih edilmektedir (II). H.pylori gastrik mukozada serbest radikallerin oluşumunu arttırarak kronik antral gastrit ve sonuçta da gastrik karsinogeneziste rol alabilir. Lipid peroksidasyonun göstergesi malondialdehit (MDA) ve antioksidan sistem enzimi olan glutatyon peroksidazm (GPx) gastrik mukozadaki düzeylerinin ölçümü; Helicobacter pylori enfeksiyonunun gastrik mukozada yaptığı oksidatif stresi yansıtacaktır. Biz bu çalışmada H. pylori (+) gastrit ve normal kontrollerde MDA ve GPx' m mukozal düzeylerini ve H.pylori eradikasyonu ile değişimini inceledik.

Gereç ve Yöntem

İç hastalıkları kliniğimiz Endoskopi ünitesinde Gastroduodenoskopik incelemeyle histopatolojik kronik aktif gastrit saptanan 16 ve normal mukozaya sahip 10 olgu alındı.

Gastroduodenoskopik inceleme Olympus GF 020 endoskopi cihazı ile yapıldı. İşlem öncesi "o2'lik gluteraldehit ile dezenfeksiyon sağlandı. Kontrol grubu ve hastalardan multipl antral ve korpus biyopsileri alındı. 2 adet biyopsi histopatolojik ve tohudin blüye boyama, 2 adet biyopsi üreaz testi, 2 adet biyopsi de MDA ve GPx tayini için serum fizyolojik içerisine alındı. Bütün hasta ve kontrol grubunda H.pylori (+)'iği açısından inceleme

ya yapıldı. Her iki testte de pozitif olanlar çalışma kapsamına alındı.

Histopatolojik kronik antral gastrit saptanan H.pylori pozitif 16 hastaya Lansaprazol 60 mg/gün 1 ay, Klaritromisin 1 gr/gün 14 gün ve Amoksisilin 1 gr/gün 14 gün süreyle eradikasyon tedavisi uygulandı. Tedavi bitiminden 1 ay sonra kontrol endoskopileri uygulandı. Kontrol endoskopisinde il. pylori (+)'liği araştırıldı. MDA ve GPx mukozal düzeyleri tayin edildi. MDA ve GPx için materyal serum fizyolojik içinde 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı ve bekletmeden çalışıldı.

Malondialdehit tayini: Satoh (12) ve Yagi'den (13) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak Shimadzu UV-1201 spektrofotometresi ile yapıldı. Dokular ağırlıklarının 10 katı hacminde soğuk 0.15 M KCl çözeltisi ile soğuk ortamda, Hettech- üniversal homojenizatörle homojenize edildi. Bu homojenattan 0.2 ml alındı. Üzerine 0.2 ml %8.riik sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml %20'lik asetik asit. 1.5 ml %0.8'lik tiyobiitirik asit. ve 0.6 ml dişi lc su; pH' m 3.4 olduğu aerobik ortamda 95°C derecede inkübasyonu oluşturuldu. Bu karışım soğutularak, üzerine 1 ml distile su ve 5 ml bütanol/piridin (15:1) karışımı eklendi, karıştırıldıktan sonra organik faz santrifüj edilerek ayrıldı. Homojenat içermeyen bir ayıraç körüne karşı absorbanslar 532 dalga boyunda okundu. Sonuçlar nmol/gram doku olarak tanımlandı.

Glutatyon peroksidaz ölçümü: Randox firmasının enzimatik UV metoduyla çalışan RANSEL adlı ticari kiti (14) Technicon RA-XT otoanalizöründe ölçüldü.

GPx kümen hidroperoksit (ROOH) varlığında redükte glutatyonun okside glutatyona yükseltgenmesini katalize eder. Kümen hidroperoksitin bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu (iSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımıyla GSFI'a indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasında absorbans farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçüldü (15) Reaksiyon küvetine 0.1 ml tris-EDTA tamponu, 0.02 ml glutatyon çözeltisi. 0.1 ml glutatyon redüktaz, 0.1 ml NADPH. 0.01 ml homojenat ve 0.66 ml distile su konuldu; karıştırıldıktan sonra 37°C'de 10 dakika tutuldu. Bu süre sonunda 0.01 ml t-bülirilhidroperoksit ilave edildi ve absorbans değişimi 340 nm'de takip edildi. Ayıraç körü olarak t-bütüriilhidroperoksit

Tablo 1. Normal ve HP (+) hastalarda Malondialdehid (MDA) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeylerinin karşılaştırılması (Mann Whitney U Testi).

Grup	Yaş	n	MDA (nmol/g doku)	GPx (ü/mg protein)
Kontrol (Normal histoloji)	42.95 ± 16.88	(5 E, 5 K)	22.43 ± 8.48	127.79 ± 76"
Hastalar	44.25 → 16.65	(5 H, 11 K)	191 ± 16.3 *	168.27 ± 103.77

* p < 0.001, ** p < 0.05

verme distile su konuldu. Sonuçlar tinitc/mg protein olarak tanımlandı.

Kontrol ve hasta grubunda son bir ay içerisinde antibiyotik kullanımı anemnezi olanlar, antiülser tedavi alanlar, başka bir nedenle ilaç almak zorunda olanlar çalışma kapsamına alınmadı. Sigara ve alkol alımı sorularak kaydedildi.

İstatistiki değerlendirmede Man Whitney U ve Wilcoxon testleri kullanıldı.

Sonuçlar

Histopatolojik Kronik aktif gastrit saptanan ve H. pylori pozitif 16 hastanın yaş ortalaması 44.25 ± 16.65 (5K.11E), Histolojik olarak normal mukozaya sahip 10 olgunun yaş ortalaması 42.95 ± 16.88 idi.

H. pylori () gastritli 16 hastada tedavi öncesi Malondialdehid düzeyi ortalama 191 ± 16.3 nmol/g doku, H. pylori (-) normal histolojiye sahip olgularda 22.43 ± 8.48 nmol/g doku idi. İkisi arasındaki fark istatistiki olarak oldukça anlamlı idi. (p < 0.001).

Hasla grubunun Glutasyon peroksidaz düzeyi ortalama 168.87 ± 103.77 ü/mg protein. Kontrol grubunun ortalama 127.79 ± 76 ü/mg protein idi ve aradaki fark anlamlı değildi (p > 0.05), (Tablo 1).

MDA'nın H. pylori eradikasyon tedavisi sonrası düzeyleri ortalama 89.75 ± 47.87 nmol/g doku (29-180) idi. Aradaki fark anlamlıydı (P = 0.0086; p < 0.01). GPx tedavi sonrası ortalama 91.25 ± 48.01 ü/mg protein (30-70) idi (P = 0.0009; P < 0.001), (Tablo 2).

H. pylori (•) kronik aktif gastriti olan grupta 4 hasta sigara kullanıyordu. Kontrol grubunda ise 2 kişi sigara kullanıyordu.

Tablo 2. H. pylori (+) Gastrit hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası Malondialdehid (MDA) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeylerinin karşılaştırılması (Wilcoxon Testi)

Grup	H. pylori (+) Gastrit		P
	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	
MDA (nmol/g doku)	191 ± 16.3	89.75 ± 47.87	P < 0.01
GPx (ü/mg protein)	168.87 ± 103.77	91.25 ± 48.01	p < 0.001

Tartışma

Serbest radikaller oldukça toksik kimyasal oluşumlardır ve gastroduodenal hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Düzeylerinin artmasında, diyetdeki antioksidan yetersizliği, sigara kullanımı gibi faktörlerin yanında bir önemli faktör de H. pylori enfeksiyonudur (16). H. pylori, kronik antral gastritte reaktif oksijen metabolitlerinin üretimini arttırdığı ve antral mukozadaki H. pylori yoğunluğu ile serbest oksijen radikalleri arasında korelasyon olduğu saptanmıştır (17).

H. pylori pozitifliği ile gastrik kanser arasında ilişki olduğu gösterildikten (18) sonra mikroorganizmanın karsinogenezi hangi mekanizmayla etkili olduğu üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Nitrik oksit ve serbest oksijen radikalleri enfekte ve inflamasyonlu dokular tarafından üretilmekte ve farklı mekanizmalarla karsinogenezi etkili olmaktadır. Oksijen serbest radikalleri ekstrasellüler matrikste hyaluronik asit ve kollajen yapısında değişiklik meydana getirerek dokularda hasara neden olmaktadır. Hücre membran yapısındaki fosfolipidlerdeki poliansatüre yağ asit-

lerinin peroksidasyonu ile de doğrudan hücrelere zarar vermektedirler MDA düzeyi serbest oksijen radikallerinin lipidler üzerindeki hasarım ve hücre zarında yaptığı hasarı yansıtır (19). Drake ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Helicobacter pylori gastritinde malondialdhit konsantrasyonu normal histolojiye sahip olanlara göre anlamlı yüksek bulunmuştur (19). Bizim çalışmamızda da malondialdhit düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Antioksidan etkiyi gösteren glutatyon peroksidaz aktivitesi ise normal histolojiye göre anlamlı bulunamadı. Bu H. pylori'nin oluşturduğu oksidatif stresin baskın olduğunu düşündürmektedir. MDA lipid peroksidasyonu ürünüdür ve oksidatif hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (20). Hahm ve arkadaşları H.pylori gastritinde DNA'daki serbest radikallere bağlı hasarın göstergesi olarak kabul edilen 8- hidroxydeoxyguanosinc düzeyini yüksek saptamışlardır (4). Bu da H. pylori'nin yolaçtığı kronik inflamasyonun oksidatif strese neden olduğu; bunun da uzun dönemde hücresel düzeyde hasara yol açarak diğer faktörlerle birlikte gastrik karsinogeneziste etkili olabileceğini gösterir. Sigara kullanımı da serbest radikallerin düzeyini etkileyebilir. Sayı yeterli olmadığından sigara kullanan ve kullanmayanlar arasında karşılaştırma yapılamadı.

Askorbik asidin antioksidan olarak gastrik mukozada serbest radikal tutucu olarak rol aldığı ve H. pylori gastritinde ascorbyl radikal düzeyinin arttığı gösterilmiştir (19). Yine aynı çalışmada kombine tedaviyle yapılan H. pylori eradikasyonundan sonra MDA düzeyi tedavi öncesine göre düşük bulunmuştur. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise H.pylori (+) grupta tek ve kombine tedavilerle serbest radikal düzeylerinde anlamlı azalma saptanmıştır (21). Tanyalçm ve arkadaşlarının çalışmasında üçlü eradikasyon tedavisi sonrası redükte glutatyon düzeyi yükselmiştir (22).

Lansaprazol, klaritromisin ve amoksisilinden oluşan üçlü tedaviyle Helicobacter pylori eradikasyonu sağlandıktan sonra ölçülen malondialdhit ve glutatyon peroksidaz aktivitesi başlangıca göre anlamlı derecede azalmıştır. Bu da Helicobacter pylori eradikasyonu ile bu mikroorganizmanın yol açtığı oksidatif stresin ortadan kaldırılabilceğini göstermektedir.

Sonuçta Helicobacter pylori gastrik karsinogeneziste antral mukozada serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırmak suretiyle rol oynayabilir. Bu bizim çalışmamızda da gösterildi. Helicobacter pylori eradikasyonu ile bu oksidatif stres ortadan kalkmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Tytgat GN, Noach LA, Rauws EA. Helicobacter pylori infection and peptic ulcer disease. Gastroenterol Clin North Am 1993; 221:27-39. 2.
2. Tytgat GN, Lee A, Graham DY et al. The role of infection agents in peptic ulcer disease. Gastroenterol hit 1993; 6:76-89.
3. IARC (1994) Schistostmiasis, Liver Flukes and Helicobacter pylori. IARC Scientific Publication no 61. International Agency for Research on Cancer. Lyon. France. 177-175.
4. Halım BK, Lee Jae K, Choi Yun S et al. Possibility of chemoprevention by the eradication of helicobacter pylori: Oxidative DNA damage and apoptosis in H.pylori infection. Am J Gastroenterol 1997; 93:1853-56.
5. Nose K, Shibanuba M, Kikuchi K et al. Transcriptional activation of early -response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. Eur J Biochem 1991; 201:99-106.
6. Yagi K. A Biochemical approach to atherogenesis. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Tibs. 1 I. 1986; 18-9.
7. Dingilloğlu N, Özmen D, Bayındır O ve ark. Diabetiklerde Eritrosit ve lipit peroksidleri. Eritrosit CSH ve Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz düzeyleri. Biyokimya Dergisi 1993; XVIIIE3:13-8.
8. Esterbauer H. Lipid peroxidation product: formation, chemical properties and biological activities. Free Radicals in liver injury. Editors. Poli G., Cheeseman KIL, Dianzani MLL S latter TF. Irl Press. Oxford. 1985: 29-47.
9. Mc Cord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. Surgery 1983; 94:412-4.
10. Başağa H. Proteinlerin radikaller tarafından inaktivasyonu ve antioksidan maddelerin rolü. Biyokimya Dergisi 1987; 3:25-33.
11. Mussalo RH. Poikolainen K, Karhkainen P and Ielito j. Decreased serum selenium and magnesium levels in drunkcnes arrestees. Drug and Alcohol Dependence 1987; 20:95-103.
12. Satoh K. Scrum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978; 90:37-43.
13. Yagi K. Assay of Plasma or Serum. Methods in Enzymology 1984; 105:328-31.
14. Yüreğir G. Temel ve Klinik Biyokimya da ileri teknoloji yöntemleri. Editörler. YüreğirG, Arpacı A., Tu l i A. (Ti Tıp Fakültesi yayını. Adana. 1995: 1-23

15. Ransel. Cıpx lay in kiti. Randox laboratories Ltd.. Diamond Road. C'rumlin, Co. Antrium, UK. BT29 4 QY. 1996.
16. P11111 PS, (ireen C.I, Jacyna MR ve ark. A radical view of the stomach: the role of oxygen-derived free radicals and anti-oxidants in gastroduodcnal disease. Eur J Gastroemerol-Hcpatoi 1995; 7(3):265-74.
17. Davies CıR. Banatvala N. Collins CE ve ark. Relationship between infective load of Helicobacter pylori and reactive oxygen metabolite production in antral mukosa. Scand .1 Gastroenterol 1994; 29 (5L419-24.
- 1 S.Menegato M, Vana D. Miglioli M el al. Helicobacter pylori in patients with gastric and non gastric cancer. Am J Gastroenterol 1995; 90:1278-81.
- 1 O.Drake MJ, Davies M, Mapstone PN, et al. Ascorbic acid may protect aganist human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. Carcinogenesis 1090; 17:559-62.
20. Dumont E, Petit E, Tarrade T, et al. U.V-C irradiation-induced peroxidative degradation of microsomal fatty acids and proteins: protection by an extract of ginkgo biloba Free-Radical Biology & Medicine 1992; 13:197-203.
21. Yenice N, Aksoy N, Yücel M, ve ark. Serbest oksijen radikalleri ve Helicobacter pylori. Turk J Gastroenterol 1996; 7 (suppl); B3.
22. Tanyalçını T. Özütemiz Ö, Kutay F ve ark. Helicobacter pylori gastritinde mide mukozası okside ve redtikte glutatyon düzeyleri. Türk .1 Gastroenterol 1997; 8 (suppl 1):63.