

Helicobacter Pylori ile Enfekte Vakalarda Clarithromycin+Amoxicillin Tedavisinin Oksidatif DNA Hasarı Üzerine Etkisi

Yıldız DİNÇER¹, Tulay AKÇAY¹, E. İlker SAYGILI¹, E.Yeliz ERSOY², Osman TORTUM²

¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilimdalı, İSTANBUL

ÖZET

Epidemiyolojik çalışmalar helicobacter pylori ile enfekte kişilerde gastrik kanser oluşumunun enfekte olmayan kişilere göre daha yüksek olduğu göstermekte, bu durumdan helicobacter pylori-aracılı oksidatif DNA hasarının sorumlu olduğu düşünülmektedir. Helicobacter pylori ile enfekte vakalarda clarithromycin+amoxicillin tedavisinin oksidatif DNA hasarı üzerine etkisini incelemek amacıyla iki haftalık clarithromycin (1 g/gün)+amoxicillin (1g/gün) tedavisi öncesi ve sonrasında DNA hasarı DNA zincir kırıkları ve formamidoprimidin DNA glikozilaz (fpg)-duyarlı bölgeler bazında belirlendi. Comet yöntemi ile ölçülen fpg-duyarlı bölgelerin sıklığının tedavi sonrasında azaldığı (P<0.001) ancak DNA zincir kırıkları sıklığının değişmediği saptandı. fpg-duyarlı bölgelerin sıklığının yaşla pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi (r: 0.59; P<0.05). Bulgular helicobacter pylori ile enfekte kişilerde clarithromycin +amoxicillin tedavisinin oksidatif DNA hasarını azaltmak yoluyla helicobacter pylori-aracılı mide kanseri oluşum riskini azaltabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Helicobacter pylori, oksidatif stres, comet yöntemi, DNA zincir kırıkları, fpg-duyarlı bölgeler

ABSTRACT

The Effect of Clarithromycin+amoxicillin Treatment on Oxidative DNA Damage in Helicobacter Pylori Infected Cases

Epidemiological studies revealed increased gastric cancer risk in helicobacter pylori-infected cases and Helicobacter pylori-mediated oxidative DNA damage is suggested as responsible factor. In order to examine the effect of clarithromycin+amoxicillin treatment on oxidative DNA damage in helicobacter pylori-infected cases, DNA damage in the basis of frequency of DNA strand breaks and formamidopyrimidine DNA glycosylase (fpg)-sensitive sites were determined before and after two weeks of treatment with clarithromycin (1 g/day) and amoxicillin (1 g/day). The frequency of fpg-sensitive sites determined by the comet assay was found to be decreased after the treatment (p<0.001) but frequency of DNA strand breaks was unchanged. Frequency of fpg-sensitive sites was found to be positively correlated with age (r: 0.59; p<0.05). Our data suggested that treatment of helicobacter pylori by clarithromycin +amoxicillin may prevent the helicobacter pylori-mediated gastric cancer risk by decreasing oxidative DNA damage in helicobacter pylori infected patients.

Key Words: Helicobacter pylori, oxidative stress, comet assay, DNA strand breaks, fpg-sensitive sites

GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü tarafından birinci sınıf karsinogen olarak kabul edilen (1) helicobacter pylori gastrit ve peptik ülser patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Helicobacter pylori ile enfekte vakaların çoğunluğu asemptomatik olmakla birlikte, küçük bir bölümünde kademeli olarak atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve gastrik karsinom ortaya çıkmaktadır (2). Helicobacter pylori ile enfekte kişilerde gastrik kanser oluşumunun enfekte olmayan kişilere göre yaklaşık dört kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (3). Bu durumdan inflamasyon nedeniyle artmış oksidatif stresin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kronik inflamasyonda nötrofil ve makrofajlarda respiratuar patlama sırasında çok miktarda oksijen ve nitrojen radikalleri oluşmakta ve bunlar DNA ile etkileşerek kansere yol açabilen zincir kırıkları, nokta mutasyonları ve kromozom anormalileri gibi genetik değişikliklere neden olabilmektedir. Radikallerin DNA ile etkileşimi sonucu en fazla miktarda oluşan ve en mutajenik DNA hasarı 8-hidroksideoksiguanozindir (8-OHdG). 8-OHdG, hidroksil radikalının DNA bazlarından guaninin 8. karbonunu oksitlemesi ile oluşur. 8-OHdG, DNA replikasyonu sırasında sitozin yerine adeninle eşleşerek G:C → T:A mutasyonuna neden olur (4). DNA üzerindeki 8-OHdG bileşikleri, 8-oksoguanin glikozilazlar tarafından kesilerek uzaklaştırılır. Onarımın yetersiz olduğu koşullarda hasar kalıcı hale gelir. Bu baz değişimi mutasyona uğramış protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla görülmektedir (5).

Comet assay (tek hücre jel elektroforezi) DNA zincir kırıkları sıklığını gösteren hızlı, kolay ve duyarlı bir yöntemdir. İlk olarak 1989 yılında Singh ve ark. (6) tarafından geliştirilen yöntem daha sonra çeşitli modifikasyonlarla genotoksisite ve apoptoz araştırmalarında sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. 8-OHdG'ne spesifik bakteriyel bir endonükleaz olan formamidoprimidin DNA glikozilaz (fpg) kullanılarak, bu hasarın bulunduğu bölgelerde ilave kırıklar oluşturmak yoluyla DNA üzerindeki 8-OHdG kalıntılarının sıklığı comet assay ile belirlenebilmekte ve oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (7). Bu çalışmada helicobacter pylori ile enfekte vakalarda 2 haftalık clarithromycin+amoxicillin tedavisinin DNA zincir kırıkları ve fpg-duyarlı bölgelerin sıklığı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

HASTALAR VE YÖNTEM

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Endoskopi Ünitesinde alınan biyopsi örneklerinde helicobacter pylori (+) bulunan 19 vaka çalışma kapsamına alındı. Yaş ortalaması 39±13 olan vakaların 11'i kadın 8'i erkekti. Çalışmaya alınan vakaların beslenme ve yaşam tarzları benzer olup, hiç biri sigara, vitamin ve oksidan/antioksidan sistemle etkileşebilecek ilaç kullanmıyordu. Son bir ay içinde herhangi bir antibiyotik kullanmamışlardı. Hiç birinin diyabet, ateroskleroz ya da malign bir hastalığı yoktu. Karaciğer, böbrek ve tiroid fonksiyonları normaldi. 3 ml heparinli kan örneği alındıktan sonra hastalara iki hafta süre ile clarithromycin (1 g/day) and amoxicillin (1 g/day) verildi. Tedavi sonunda vakalardan tekrar kan örnekleri alındı.

Tek hücre jel elektroforezi ile DNA zincir kırıkları ve fpg-duyarlı bölgelerin sıklığının belirlenmesi (6)

Düşük erime noktalı agar jel ile kaplanmış mikroskop lamı üzerine heparinize kan yayılarak üzeri ikinci bir agar tabakası ile kaplandı. Lam yüksek konsantrasyonda tuz içeren lizis çözeltilisine daldırılarak çekirdek materyali dışında tüm hücre içeriğinin parçalanması sağlandı. Daha sonra pH'ı 8 olan tampon ile yıkanarak hücre artıkları uzaklaştırıldı. Lam üzerinde geriye kalan çift sarmal DNA kuvvetli alkali ortamda (pH >11) bekletilerek, zincir kırıklarının bulunduğu bölgelerde çift sarmal yapının açılması sağlandı. Alkali ortamda elektroforez uygulandıktan sonra pH nötralize edildi ve etidyum bromidle boyanan materyal floresan mikroskopunda incelendi.

Elektroforezde anoda doğru sürüklenen DNA bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir. DNA'nın sağlam kısmı yıldızın başını, kırık zincirler ise kuyruğunu oluşturur. Floresan mikroskopunda verdikleri görüntüye göre DNA'lar hasar bakımında 5 kategoriye ayrılır. Çalışmada her vaka için iki ayrı lam hazırlandı. Her bir lam üzerinde 100 adet DNA incelenerek, iki lamdan elde edilen sayıların ortalaması alındı ve her bir kategoride yer alan DNA sayısı saptanarak zincir kırıkları sıklığı, kuyruk kısmında bulunan % DNA'yı gösteren arbitrary ünite (au) olarak ifade edildi. Oksidatif DNA hasarını gösteren fpg-duyarlı bölgelerin sıklığını ölçmek için, lizis işleminden sonra DNA bakteriyel bir enzim olan fpg ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. fpg ile inkübe edilmiş lamda bulunan zincir kırıkları sıklığından fpg ile

inkübe edilmemiş lamda bulunan zincir kırıkları sıklığı çıkartılarak, oksidatif baz hasarının net miktarı bulundu.

Elde edilen sonuçlar ortalama \pm standard sapma olarak ifade edildi. Tedavi öncesi ve sonrasına ait bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi non-parametrik Wilcoxon testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistik olarak anlamlı kabul edildi. Korelasyon analizinde Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı.

SONUÇLAR

Helicobacter pylori ile enfekte vakalarda iki hafta clarithromycin+amoxicillin tedavisi öncesi ve sonrasında belirlenen DNA zincir kırıkları sıklığı ve oksidatif DNA hasarının göstergesi olan fpg-duyarlı bölgelerin sıklığı Tablo 1’de verilmiştir. Tedavi sonrasında DNA zincir kırıkları sıklığında anlamlı bir değişim belirlenmedi. Buna karşılık fpg-duyarlı bölgelerin sıklığının tedavi sonrasında anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0.001$), tedavi öncesinde fpg-duyarlı bölgelerin sıklığının yaş ile korele olduğu saptandı ($r: 0.59$; $p < 0.05$).

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar gastrik enflamatuvar hastalıklarda oksidatif hasarın arttığını ortaya koymakta (8-10), p53 gibi tümör baskılayıcı genlerde oksidatif DNA hasarı birikiminin gastrik tümör oluşumunda önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (11). Gerek DNA üzerindeki 8-OHdG kalıntılarının direkt ölçümü (12-14), gerekse DNA zincir kırıkları ve fpg-duyarlı bölgelerin belirlenmesiyle yapılan çalışmalarda (15-18) helicobacter pylori ile enfekte gastrik mukozada DNA hasarının enfekte olmayan normal mukozadakinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Laderia ve ark. (16) helicobacter pylori (+) gastritli hastalarda yaptıkları çalışmada comet yöntemi ile ölçülen DNA hasarının gastritin yoğunluğu ile direkt ilişkili olduğunu ve DNA hasarının 50 yaş üstü vakalarda gençlere göre daha yüksek bulunduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar helicobacter pylori ile enfekte kişilerde DNA hasarının sadece gastrik mukozada yüksek olmayıp, aynı zamanda periferik lökositlerde de enfekte olmayan kişilerdekine göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (17).

Normal olarak, eğer helicobacter pylori enfeksiyonu oksidatif DNA hasarını arttırıyorsa helicobacter pylori eradikasyonu sonrasında DNA hasarının azalması beklenir. Geniş tutulumlu gastritli hastalardan helicobacter pylori ile enfekte olanlarda antral mukozada 8-OHdG düzeyinin enfekte olmayan gastritli hastalardakine göre daha yüksek olduğu, helicobacter pylori eradikasyonu sonrasında hem antral mukozada 8-OHdG düzeyinin hem de gastrik sıvı mutajenesinin azaldığı belirlenmiştir (13). Benzer olarak Hahm ve ark. (14) helicobacter pylori ile enfekte hastalarda helicobacter pylori eradikasyonu sonrasında gastrik mukozadan alınan biyopsi örneklerinde 8-OHdG düzeyinin tedavi öncesine göre azaldığını bildirmişlerdir. Ancak tam tersi sonuçlar ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Everett ve ark.(15) helicobacter pylori ile enfekte kişilerde antral biyopsi örneklerinden izole edilen epitelyal hücrelerdeki DNA hasarını araştırdıkları çalışmada, normal mukozadaki DNA hasarının gastritli bölgedekinden daha yüksek olduğunu ve 6 haftalık eradikasyondan sonra alınan örneklerde gastritli bölgede DNA hasarının arttığını fakat yine de normal mukozadakinden daha düşük düzeyde olduğunu belirlemiş ve helicobacter pylori ile enfekte gastrik epitel hücrelerindeki düşük DNA hasarının gastritte artmış hücre dönüşümünden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine benzer olarak, Farinati ve ark. (12) helicobacter pylori ile enfekte vakalarda antruma ait biyopsi örneklerinde helicobacter pylori eradikasyonu sonrasında 8-OHdG düzeyinin arttığını saptamış ve eradikasyonun oluşmuş hasarı azaltmadığı sonucuna varmışlardır. Bir başka grup araştırmacı ise helicobacter pylori ile enfekte çocuklarda eradikasyon öncesi ve sonrasında idrar 8-OHdG düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (19).

Çalışmamızda elde edilen bulgular iki haftalık clarithromycin+amoxicillin tedavisinin baz oksidasyonunu azalttığı ancak DNA zincir kırıkları üzerine bir etkisi olmadığını göstermektedir. DNA üzerinde zincir kırıkları oluşumu sadece oksidatif strese bağlı olmayıp, UV, radyasyon ve DNA hasarlarının onarımı sırasında da geçici olarak ortaya çıkabilmektedir (20). Oysa 8-OHdG kalıntıları sadece oksijen ve nitrojen radikalleri tarafından oluşturulur. 8-OHdG kalıntılarının clarithromycin +amoxicillin tedavisi sonrasında azalması bu vakalarda oksidatif stresin azaldığını göstermekte, antibiyotik tedavisinin sade-

Tablo 1. *Helicobacter pylori* ile enfekte hastalarda tedavi öncesi ve sonrası DNA hasar parametreleri

	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası (n= 19)
DNA zincir kırıkları sıklığı (au)	99±22	101± 24
fpg-duyarlı bölgeler sıklığı (au)	159± 28	135± 21*

*p<0.001

ce *Helicobacter pylori* ile ilişkili gastrit ve peptik ülserin tedavisinde değil olası malignitelerin de önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. International Agency for Research of Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 61:177-241, 1994.
2. Obst B, Wagner S, Sewing KF, et al. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. Carcinogenesis 21: 1111-1115, 2000.
3. Hahm KB, Lee KJ, Kim JH, et al. *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. Dig Dis Sci 43(suppl 9): 72S-77S, 1998.
4. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, et al. 8-Hydroxyguanine an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. J Biol Chem 267:166-172, 1992.
5. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. Cancer Res 58: 4023-4037, 1998.
6. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-191, 1988.
7. Collins AR, Raslova K, Somorovska M, et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. Free Radic Biol Med 25: 373-377, 1998.
8. Farinati F, Della Libera G, Cardin R, et al. Gastric antioxidant, nitrites, and mucosal lipoperoxidation in chronic gastritis and *Helicobacter pylori* infection. J Clin Gastroenterol 122: 275-281, 1996.
9. Farinati F, Cardin R, Degan P, et al. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. Gut 42: 351-356, 1998.
10. Danese S, Cremonini F, Armuzzi A, et al. *Helicobacter pylori* CagA-positive strains affect oxygen free radicals generation by gastric mucosa. Scand J Gastroenterol 36: 247-250, 2001
11. Choi J, Yoon SH, Kim JE, et al. Gene-specific oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori* infected human gastric mucosa. Int J Cancer 99: 485-490, 2002.
12. Farinati F, Cardin R, Russo VM, et al. Differential effects of *Helicobacter pylori* eradication on oxidative DNA damage at the gastroesophageal junction and at the gastric antrum. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13 (11 Pt 1): 1722-1728, 2004.
13. Nishibayashi H, Kanayama S, Kiyohara T, et al. *Helicobacter pylori*-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 18: 1384-1391, 2003.
14. Hahm KB, Lee KJ, Choi SY, et al. Possibility of chemoprevention by the eradication of *Helicobacter pylori*: oxidative DNA damage and apoptosis in *H. pylori* infection. Am J Gastroenterol 92: 1853-1857, 1997.
15. Everett SM, White KL, Drake IM, et al. The effect of *Helicobacter pylori* infection on levels of DNA damage in gastric epithelial cells. Helicobacter 7:271-280, 2002.
16. Laderia MS, Rodrigues MA, Salvadori DM, et al. DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13: 631-637, 2004.

17. Laderia MS, Rodrigues MA, Freire-Maia DV, et al. Use of Comet assay to assess DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*: comparisons between visual and image analyses. *Mutat Res* 586: 76-86, 2005.
18. Arabski M, Klupinska G, Chojnacki J, et al. DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells. *Mutat Res* 570: 129-135, 2005.
19. Shimizu T, Lee T, Shoji H, et al. Urinary 8-hydroxydeoxy- guanosine excretion in children before and after therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Acta Pediatr* 92: 1026-1028, 2003.
20. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. 1th edition. Washington, ASM Press, 1995.

Yazışma Adresi:

Dr. Yıldız Dinçer
Dere Sok., Umut Ap. No: 21/44
Sahrayı Cedid
Erenköy
İSTANBUL

Tel: İř (0.212) 414 30 00 / 22407
e-mail: stare63@yahoo.com