

Helicobacter Pylori İnfeksiyonunda Anti-CagA-Ak İle Sitokin Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması

RESEARCH OF RELATIONSHIP BETWEEN CagA CYTOTOXIN AND CYTOKIN LEVELS IN HELICOBACTER PYLORI INFECTION

Fadile YILDIZ ZEYREK*, Hatice ÖZBİLGE*, Ayser UZALA MIZRAKLI**, C. Dost ZEYREK***

* Yrd.Doç.Dr., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik mikrobiyoloji AD,

** Uz.Dr., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,

***Yrd.Doç.Dr., Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri AD, ŞANLIURFA

Özet

Amaç: Bu çalışma *Helicobacter pylori* ile infekte kişilerde ve cag A sitotoksini ile sitokinler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla planlandı.

Gereç ve Yöntemler: Tüm hastalara H.pylori-IgG, cagA-Ak ve sitokinler ELISA yöntemiyle bakılmıştır. 102 H.pylori-IgG pozitif ile 30 H.pylori-IgG negatif hasta çalışmaya alınmıştır.

Bulgular: H.pylori-IgG pozitif 102 hastanın 72'sinde cagA-Ak pozitif bulunmuştur. cagA-Ak pozitif ve negatif hastalarda IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, ve TNF- α düzeylerine bakılmıştır. Sonuçlar kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. CagA-Ak pozitif olan hastaların serum IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α düzeyleri cagA-Ak negatif gruba göre daha yüksek bulunmuştur. İstatistiksel analizler ki-kare ve ANOVA testleri kullanılarak yapılmıştır. Buna göre iki grup arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur (p< 0.05).

Sonuç: CagA sitotoksini salgılayan H.pylori suşlarının yaptığı infeksiyonda artmış sitokin düzeylerinin doku hasarlanmasının nedenlerinden biri olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, CagA, Sitokinler

T Klin Gastroenterohepatoloji 2004, 15:18-22

Summary

Objective: This research was planned to detect the relation of cagA cytotoxin with cytokines in *Helicobacter pylori* infected patients. 102 *H.pylori* IgG antibody positive and 30 antibody negative subjects were involved in this research.

Material and Methods: The measurement of cagA cytotoxin antibodies in *H.pylori* IgG antibody positive patients was done by ELISA method.

Results: With this technique, cagA antibodies were found to be positive in 72 of 102 patients. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α levels were measured in both cagA positive and negative subjects, and the results were compared among groups. The serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α in serum of cagA antibody positive patients were higher than those of cagA antibody negative patients (p<0.05).

Conclusion: It is suggested that high levels cytokin is leading causes of gastric tissue damage in the cagA pozitif *H.pylori* infection

Key Words: *Helicobacter pylori*, Cag A, Cytokines

T Klin J Gastroenterohepatol 2004, 15:18-22

Helicobacter pylori (H. Pylori) infeksiyonu dünyadaki en yaygın kronik bakteriyel infeksiyonlardan biridir. Gelişmiş ülkelerde yetişkinlerin yarısından çoğu gelişmekte olan ülkelerde ise toplumun %90'ından fazlası bu bakteri ile infekte olmuştur. Bu infeksiyon ağırlıklı olarak çocukluk çağında kazanılır ve çoğu komplikasyonsuz seyreder. Bununla birlikte infekte bireylerin küçük bir yüzdesinde peptik ülser, distal gastrik karsinom yada MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lenfoma gelişmektedir (1).

Helicobacter pylori suşları arasında virülans ve patojenite farkı vardır. Genomik DNA'nın endonükleaz analizi ile ortaya konulması ile farklı fenotipik özellikler ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında bulunan Cytotoxin associated gene A (cagA) 120-kDa ağırlığında bir antijendir. CagA'ya karşı oluşan antikolar kronik süperfişial gastritli hastaların %60'ında pozitif iken duodenal ülserli hastaların %100'ünde pozitif bulunmuştur. Bu sitotoksinin peptik ülser hastalığı bulunan kişilerde ülserojenik olduğu kabul edilmektedir (2).

Tablo 1. Hastaların yaş ve cinslerine göre anti-H. pylori IgG ve anti-H. pylori cagA pozitiflik dağılımı

Yaş	Anti-H. pylori IgG pozitif				Anti-H. pylori cagA pozitif			
	Erkek	Kadın	Toplam	%	Erkek	Kadın	Toplam	%
15-24	9	7	16	15.6	8	6	14	19.44
25-34	17	12	29	28.4	10	8	18	25
35-44	13	8	21	20.5	8	6	14	19.44
45-54	15	9	24	23.5	10	7	17	23.6
55 yaş ve üstü	7	5	12	11.7	4	5	9	12.5
Toplam	61	41	102	100	40	32	72	100

Sitokinler bakterilerin lipopolisakkarit ürünlerine karşı mononükleer fagositlerin stimüle edilmesiyle üretilen inflamasyonda rol alan mediatörlerdir. Helicobacter pylori infeksiyonunda mukozadan birçok sitokin salgılanmaktadır (3, 4). Bu çalışmada H. pylori infeksiyonlu kişilerde anti-cagA antikoru ile çeşitli sitokinlerin serum düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışma grubu Ocak- Aralık 2001 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye polikliniği'ne dispepsi şikayeti ile başvuran en az 4 haftadır herhangi bir antibiyotik ve asit baskılayıcı tedavi görmeyen hastalardan seçilmiştir. Çalışmaya ELISA yöntemiyle anti-H. pylori IgG'si pozitif bulunan 102 hasta ve kontrol grubu olarak 30 anti-H. pylori IgG'si negatif kişi alınmıştır. Hastaların 72'si erkek (%55.5), 60'ı kadın (%45.5) ve yaş ortalaması 39.1 (en küçüğü 16 yaş, en büyüğü 75 yaş) idi.

Bu çalışmadaki hastalar üç gruba ayrıldı. Birinci grup anti-H. pylori IgG (+), anti-cagA (+), ikinci grup anti-H. pylori IgG (+), anti-cagA (-) ve üçüncü olarakda kontrol grubu anti-H. pylori IgG (-), anti-cagA (-) olarak belirlendi.

Her üç gruptan alınan serumlar anti-H. pylori Cag A (Equipar, İtalya), TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-10 (Cytelisa Human, USA), IL-8 (Accucyte Human, USA), IL-12 (İmmunotech, France) ELISA yöntemiyle çalışılmıştır. Kitler üretici firmanın önerilerine uygun olarak çalışılmıştır.

Bulgular bilgisayarda SPSS Windows 10.0

program kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analizlerde yaş ve cinsiyetler arasındaki karşılaştırmalarda ki-kare, gruplar arasındaki farklılığın araştırılmasında varyans analizi (ANOVA) ve ikili grup karşılaştırmalarında çoklu karşılaştırma testlerinden LSD (Least Significant Difference) testleri kullanılmıştır.

Bulgular

Yaş gruplarına ve cinsiyetlerine göre olguların anti-H. pylori IgG pozitiflik ve anti-H. pylori cagA pozitiflik dağılımlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 1). Anti-H. Pylori IgG'si pozitif hastaların 72'sinde (%70.5) anti-cagA antikoru saptandı.

Çalışmaya alınan tüm gruplar karşılaştırıldığında serum IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α düzeyleri yönünden gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 2).

Grupların kendi içindeki karşılaştırmalarda yani ikili grup karşılaştırmalarında serum IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α düzeyleri arasındaki fark birinci grupta diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0.05$) (Grafik 1, Grafik 2).

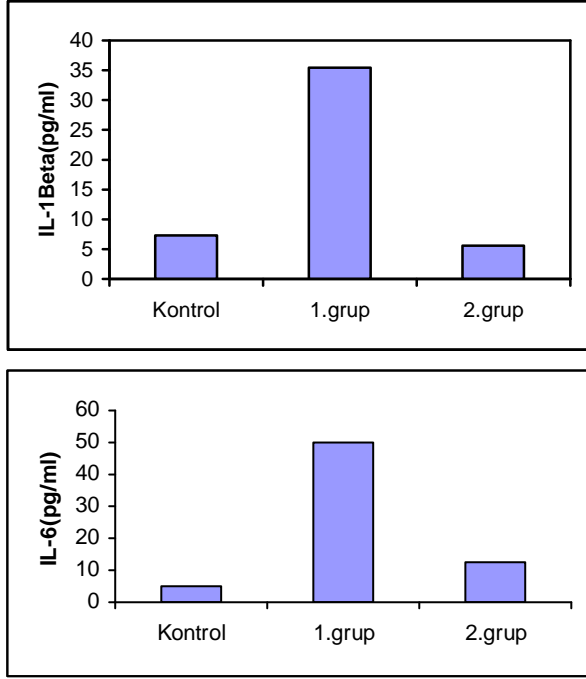
Anti-cagA antikoru negatif olan ikinci grup

Tablo 2. LSD ile yapılan grup içi karşılaştırma sonuçları

Gruplar	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-12	TNF- α
	p	p	p	p	p
1.grup-2.grup	0.001	0.000	0.000	0.000	0.002
2.gurup-3.grup	0.953	0.628	0.798	0.759	0.290
1.grup-3.grup	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

Tablo 3. H.pylori infeksiyonunda sitokinlerin ortalama deęer ve standart sapmaları

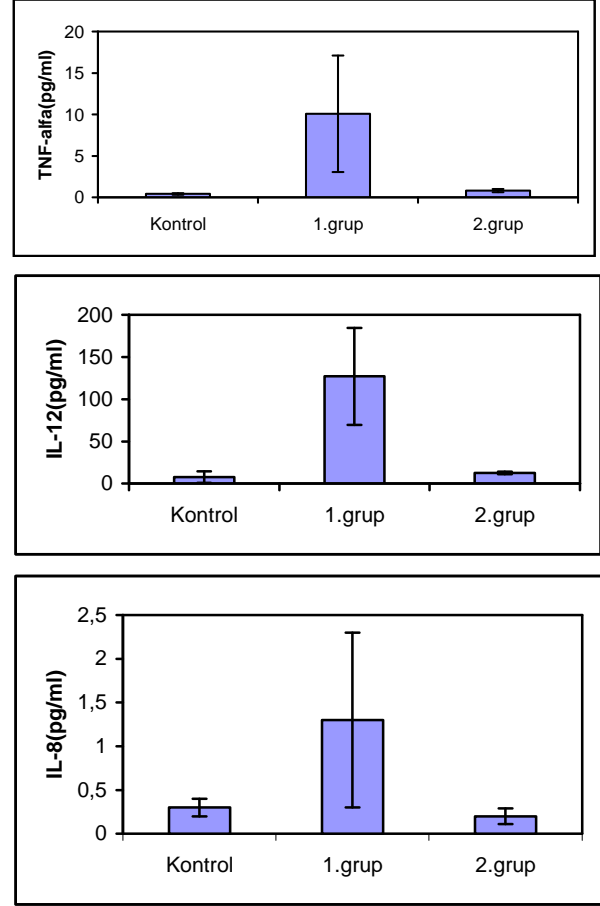
	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-12	TNF α
H. pylori IgG (+), anti-cagA (+)	35.4 \pm 53.1	50.0 \pm 69.0	1.3 \pm 1.0	127.1 \pm 57.5	10.1 \pm 7.03
H. pylori IgG (+), anti-cagA (-)	5.6 \pm 1.4	12.8 \pm 6.3	0.2 \pm 0.0	12.6 \pm 1.39	0.8 \pm 0.19
H. pylori IgG (-), anti-cagA (-)	7.3 \pm 5.8	4.9 \pm 3.4	0.3 \pm 0.0	7.61 \pm 6.92	0.4 \pm 0.1

**Grafik 1.** CagA pozitif, negatif ve kontrol gruplarının serum IL-1 β ve IL-6 düzeyleri

hastalarda kontrol grubuna göre IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- α düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmadı ($p>0.05$).

Tartışma

Helicobacter pylori'ye karşı hücrel ve humoral bağışıklık gelişmektedir. Bakterinin immün yanıtta yol açan antijenleri cytotoxin associated protein (CAP), üreaz polipeptidler, üreaz ile ilişkili 54-58 kD protein ve heat shock protein 60 (HSP 60) ile ilişkili 54 kD'luk proteindir. CAP'a karşı antikor gelişenlerde epitel yüzey dejenerasyonunun daha fazla, nötrofil infiltrasyonunun daha yoğun olduğu gösterilmiştir (5). Bu sitotoksin cagA geni tarafından yapılır ve bu gen H.pylori suşlarının %60-70'inde bulunur.

**Grafik 2.** CagA pozitif, negatif ve kontrol gruplarının serum IL-8, IL-12, TNF- α düzeyleri

CagA'ya karşı antikor bulunan kişilerde aktif gastrit ve duodenal ülser sıklıkla görülmektedir. Aynı zamanda bunlarda atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve gastrik kanser gelişme riski de artmaktadır (6).

CagA-pozitif suşlarla oluşan infeksiyonun tanımını koymak için, bakteri izolasyonu yaparak gen tayini yapılması ve cagA proteinine karşı spesifik IgG antikor tespit edilmesi olmak üzere iki yol vardır. Serum testleri cagA-pozitif suşların tespiti

için rastgele seçilen bakteri izolasyonlarından daha fazla hassastır (7). Bizde bu çalışmada serumda cagA'ya karşı antikor aradık ve %70.5 anti-cagA pozitifliği bulduk. Bu oran, çalışma grubumuzun semptomları olan ve anti-H. pylori IgG antikor pozitif olan kişilerden oluşması nedeniyle normal popülasyondan daha yüksektir. Ancak daha önce rapor edilen çalışmalarla uyumludur. Değişik hasta popülasyonlarında yapılan birçok çalışmada %54-94.4 gibi geniş bir aralıkta farklı sonuçlar bildirilmiştir (8-10).

Son yıllarda infeksiyon hastalıklarının patogeneğinde, inflamatuvar cevabı idare eden mediatörlerden olan sitokinler üzerinde durulmaktadır. H. pylori'nin yüzey epiteline yapışması, epitel hücrelerinin IL-8 dahil değişik sitokinlerin ve HLA antijenlerinin ekspresyonuna neden olur (11).

IL-1β endojen bir pirojen olup ACTH salınımını stimüle ederek kortikotropin serbestleştirici faktörün salınımını sağlar. IL-1β düzeyinin cagA-pozitif olanlarda cagA-negatif olanlara göre anlamlı derecede yüksek olarak bildiren çalışmalar vardır (12, 13).

IL-6, inflamasyonda mononükleer hücrelerin büyümesi, ayrışması ve aktivasyonu üzerinde rol oynarken aynı zamanda yardımcı T hücreleri üzerinde mitojenik bir aktiviteye sahip olup, B hücre proliferasyonuna ve immunglobulin sentezine neden olur (14, 15). Yapılan çalışmalarda serum IL-6 düzeyinin cagA-pozitif H.pylori infeksiyonlu hastalarda cagA-negatif ve kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek bulunmuştur (16-18).

IL-8 nötrofil infiltrasyonu ile birlikte olan infeksiyöz ve inflamatuvar patogeneze de rol alır (15). IL-8 T lenfositleri tarafından tanınan spesifik antijenlere karşı nonspesifik inflamatuvar hücreleri aktif hale geçiren aracıdır. IL-8'in kaynağı makrofaj endotel hücresi olup lökosit aktivasyonu sonucu salgılanır (19). IL-8 düzeyleri cagA-pozitif suşların oluşturduğu infeksiyonlarda cagA-negatif suşlara oranla oldukça yüksek olarak bildirilmiştir (12, 15, 17, 18, 20). IL-12 bakteriyel infeksiyonlarda konakçı cevabında anahtar rol oynayan bir mediatördür. Bauditz ve ark. 176 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada IL-12 dü-

zeyinin H.pylori pozitif gastritlerde yüksek olduğunu saptamıştır (13). TNF-α Gr-negatif bakterilerin hücre duvarından köken alan lipopolisakkaritlere karşı konak tarafından geliştirilen cevabın ana sitokinidir. Endojen bir pirojen olup, yüksek konsantrasyonlarda doku hasarına, yaygın intravasküler koagülasyona ve ölüme sonuçlanan şoklara neden olur. Yapılan bazı çalışmalarda TNF-α düzeyini cagA-pozitif hastalarda, cagA-negatif olan hastalara göre daha yüksek bulmuşlardır (12, 17, 21, 22).

Bu çalışmada IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α düzeyleri cagA-pozitif H.pylori infeksiyonlu hastalarda cagA-negatif hastalara ve kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Bunun yanında cagA-negatif H. pylori suş ile infekte hastalarda sitokin düzeylerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir yükseklik bulunmadı. Bu sonuçlar cagA-pozitif suşlarla infekte olan kişilerde çeşitli sitokinlerin salınımında artış olduğunu göstermektedir. CagA sitotoksininin ülserojenik bir suş olduğu, varlığında bazı sitokinlerin salınımının artması yoluyla epitelyal erozyon ve ülserasyonlara neden olduğu ve hastanın kliniğinde ağırlaşmaya yol açtığı düşünülmektedir.

Sonuçlarımız cagA genine sahip suşların çeşitli sitokinleri salınımını uyarak bu gene sahip olmayanlardan daha şiddetli inflamasyona yol açacağını düşündürmüştür. Bunun ışığında tüm H. pylori infeksiyonlu kişilerde anti-cagA antikor bakılması ve pozitif bulunanların semptomlarının olup olmadığına bakılmaksızın tedaviye alınması, ileride gelişecek atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve gastrik kanser gelişme riskini azaltabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Blaser MJ. Helicobacter pylori and related organism. Principles and practise of infectious diseases. Eds; Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Fifth Edition Churchill Livingstone inc. 2000: 2285-2291.
2. Blaser MJ. Helicobacter pylori phenotypes associated with peptic ulceration. Scan. J. Gastro 1994; 29 supp: 205; 1-5.
3. Abbas Abul K. Cellular ve molecular immunology. Immunology. 2nd Ed, WB. Saunders Company, Pennsylvania 1994: 239-46.

4. Davies GR, Banatuala N, Collins CE, Relations ship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1994; 24: 419-24.
5. Zeyrek Yıldız F. *Helicobacter pylori*'nin izolasyonu tanı metodlarının karşılaştırılması ve antibiyotik direnci. Uzmanlık Tezi. Dicle üniversitesi 1999.
6. Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere JL. Implication of the Structure of the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island in Induction of Interleukin-8 Secretion. *Infection and Immunity*, 2001 Mar; 69(3): 1625-9.
7. Cover TL, Glupczynski Y, Lage A, Barette MK, Tummuru GL, Perez-Perez, Blaser MJ. Serologic detection of infection with cagA *Helicobacter* strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1496-500.
8. Elitsur Y, Neace C, Werthanmer MC, Triest WE: Prevalance of cagA, vacA antibodies in symptomatic and asymptomatic children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* Jun 1999; 4(2): 100-105.
9. Rokkas T, Liatsos C, Karameris A, Petridou E. Serologic detection of cagA positive *Helicobacter pylori* strains predicts the presence of peptic ulcer in young dyspeptic patients. *Gastrointest Endosc* 1999; Oct; 50 (4); 511-5.
10. Ching CK, Wong BCY, Kumok E. Prevalance of cagA bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-cagA assay in patients with peptik ulcer disease and in controls. *Am J Gastroenterol* 1996; 91; 949-53.
11. Calam J. *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Investigation* 1994; 24: 501-10.
12. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Savai N, Kashima K. İnduction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* 1997; 41; 442-451.
13. Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedebitek G, Lochs H. Production of IL-12 in gastritis relates to in infection with *Helicobacter pylori*. *Clin Exp Immunol*, Aug 1999; 117 (2): 316-23.
14. Male D, *Advanced Immunology* 3th. Ed. Mosby-Times Mirror İnternational publishers limited, London; 1993: 10;1-14,.
15. Ando T, Perez-Perez GI, Kusugami K, Ohsuga M, Bloch KC, Blaser MJ. Anti-CagA Immunglobulin G Responses Correlate with Interleukin-8 Induction in Human Gastric 2000; 7(5): 803-9.
16. Kütükçüler N, Aydoğdu S, Gökşen D, Çağlayan S, Yağcı RV. İnterleukin-8 İnduction in children with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Acta Pediatr* 1997; 86 (9): 928-31.
17. Bodger J, Bromelow K, Wyatt JI, Heatley RV. IL-10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis; İmmunohistochemical localisation and invitro effects on cytokine secretion. *J Clin Pathol*, April 2001; 54 (4); 285-92.
18. Ando T, Ksugami K, Ohsuga M, Ina K, Shinoda M, Kanagoya T, Sakai T, İmada A: Differential normalization of mucosal IL-8 and IL-6 activity after *Helicobacter pylori* eradication. *Infect Immun*, 1998 Oct; 66 (10): 4742-7.
19. Gülmezoğlu E, Ergüven S. İmmünoloji. Ankara, 1995; 142-143.
20. Audibert C, Janvier B, Grignon B, Salaun L, Burucua C, Lecron L. Correlation between IL-8 induction, cagA status and vacA genotypes 153 French *Helicobacter pylori* isolates. *Res Microbiol* 2000 Apr; 151 (3): 191-200.
21. Perri F, Clemente R, Festa V, De Ambrassio CC. Serum tumour necrosis factor-alpha is increased in patients with *Helicobacter pylori* infections and cagA antibodies, *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999 May; 3(4); 290-4.
22. Saruç M, Göksel G, Özkaya S, Güçlü F, Özbakkaloğlu B. The effect of cagA status response to *Helicobacter pylori* eradication therapy in western Turkey. *Broz J Med Biol Res*, 2001 Nov; 34 (11); 1435-9.

Geliş Tarihi: 05.05.2003

Yazışma Adresi: Dr Fadile Yıldız ZEYREK
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji A.D, ŞANLIURFA
fadilezeyrek@hotmail.com