

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

***HELICOBACTER PYLORI* ENFEKSİYONLU HASTALARIN
SERUMLARINDA CA II OTOANTİKORLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sibel YİĞİT

TRABZON-2007

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

***HELICOBACTER PYLORI* ENFEKSİYONLU HASTALARIN
SERUMLARINDA CA II OTOANTİKORLARININ BELİRLENMESİ**

Sibel YİĞİT

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12.03.2007

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 05.04.2007

Tez Danışmanı : Prof. Dr. E. Edip KEHA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. E. Edip KEHA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Neşe Kaklıkkaya

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

MART 2007

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından, sabrından, anlayışından ve güler yüzünden dolayı başta hocam sayın Prof. Dr. E.Edip Keha olmak üzere bilgilerinden faydalandığım hocalarım sayın Prof. Dr. Orhan Değer, Prof. Dr. Ekin Önder, Prof. Dr. Asım Örem, Doç. Dr. S. Caner Karahan, Yrd. Doç. Dr. Birgül Kural, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Alver ve Doç. Dr. Fahri Uçar'a, özellikle hasta serumlarının temininde ve bilgi alışverişinde desteklerini eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr. Neşe Kaklıkkaya'ya, laboratuvar çalışmalarını beraber yürüttüğümüz arkadaşlarım Araş. Gör. Ahmet Menteşe ve İbrahim Turan'a, arkadaşlarım Araş. Gör. Yaşam Barlak, Meral Köse ve Mihriban Ayvaz'a, istatistik çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gamze Çan ve değerli asistanlarına, tez çalışmamdan dolayı izin ve hoşgörülerini esirgemeyen bütün M.E.B personeline, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne ve Biyokimya Anabilim Dalında burada adı geçmeyen tüm arkadaşlarıma ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mart 2007

Sibel Yiğit

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar.....	3
2.2. <i>Helicobacter Pylori</i>	6
2.3. Karbonik Anhidraz.....	8
2.4. CA ve Otoimmünite	10
2.4.1. CA II ve Otoimmün Hastalıklar.....	10
2.4.2. <i>Helicobacter Pylori</i> ve CA II Otoantikorları	11
3. MATERYAL VE METOD	13
3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler.....	13
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler.....	13
3.3. Numunelerin Toplanması.....	15
3.4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	16
3.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	17
4. BULGULAR	18
4.1. ELISA Sonuçları	18
5. TARTIŞMA.....	20
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	24
7. ÖZET	26
8. SUMMARY.....	27
9. KAYNAKLAR.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	31

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri.....	13
Tablo 2.	Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri.....	14
Tablo 3.	Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	15
Tablo 4.	Çalışma gruplarının yaş aralıkları ve cinsiyet dağılımı	16
Tablo 5.	Çalışma gruplarına ait ortalama CA II absorban ve \pm S.D değerleri	18
Tablo 6.	Gruplar arası farklılığın önem derecesi.....	19

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1. H. pylorinin üç boyutlu görünümü..... 8
- Şekil 2. Serumlarında CA II otoantikoru bulunduran gruplar ve sağlıklı bireylere ait absorban değerleri 19

KISALTMALAR

CA	: Karbonik Anhidraz
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
MHC	: Major Histocompatibility Complex
TCR	: T Hücre Reseptor
BCR	: B Cells Reseptor
Ig G	: Immunoglobulin G
S.S	: Sjögren's Sendromu
PBC	: Primer Biliyer Siroz
AIC	: Otoimmün Kolanjit
AIP	: Otoimmün Pankreatit
HCV	: Hepatit C Virüs
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
APC	: Antijen Sunan Hücre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbonik Anhidraz (CA, E.C 4.2.1.1, Karbonik hidrolizaz) mikroorganizmalardan yüksek yapılı hayvanlara kadar dağılımı olan bir enzimdir (11) . Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ihtiva eden bir metaloenzimdir. Karbonik anhidrazın bilinen yegane fizyolojik fonksiyonu, CO_2 hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemesidir. Bu reaksiyon aracılığıyla asit-baz dengesi, membranlardan sıvı ve iyon transportu, üre, yağ asitleri ve pirimidin nükleotidlerinin sentezi, mide asit salgısı, sindirim, üreme, kemik metabolizması, nöronal aktivite ve beyin omurilik sıvısının regülasyonu gibi birçok olaya katılırlar. Karbonik anhidraz enziminin halen, memelilerde bilinen 15 farklı izoenzimi vardır(12). Karbonik anhidraz izoenzimlerinin iskelet kası hasarı, nöromusküler hastalıklar, kemik metabolizması bozuklukları ve iskemik kalp hastalıklarının teşhis ve tanısında önemli bir işaret olduğu belirtilmektedir. Üzerinde en çok çalışma yapılan izoenzimlerden biri karbonik anhidraz II (CA II) dir(13). CA II, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, eritrositlerde, mide mukozasında ve beyinde bulunur.

Helicobacter pylori, insan ve diğer primatların midesine yerleşen, spiral şeklinde, gram-negatif, mikroaerofilik bir bakteridir(7). Bu mikroorganizma, vücuda bir kere girdiğinde, tedavi edilemediği takdirde ömür boyu varlığını devam ettirmektedir. Gastrit, duodenit ve peptik ülser oluşmasında da gastrik asidin yanı sıra rol oynar. *H. pyloride*, karbonik anhidrazın alfa ve beta olmak üzere iki farklı izoenzimi vardır ve bunlardan alfa izoenziminin, CA II ile olan benzerliği şaşırtıcıdır(19). Son yıllarda insan ve mikrobiyal antijenler arasındaki moleküler benzerliklerin, genetik yatkınlığın olmadığı durumlarda, otoimmün hastalıkların tetiklenmesinde önemli bir rolü olduğu gözlenmiştir.

İmmün sistemin başlıca görevi bünyenin kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır(2). Ancak bazı patolojik durumlara bağlı

olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi ile, organizmada değişen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denmektedir(3). Anti CA II otoantikoları, otoimmün pankreatit, sistemik sikleroz, dermatomyosit, polimiyosit, endometriosis, otoimmün hepatitis, Sjögren's Sendromu ve primer biliyer sirozlu hastalarda belirlenmiştir(18).

Otoimmünitenin mikrobiyal tetiklenmesi teorisi yıllar önce ortaya atılmış ve bu teori spesifik enfeksiyonlar esnasında veya hemen sonrasında bazı otoimmün hastalıkların sıklığının artışıyla ilgili gözlenen epidemiyolojik bulgular üzerine kurulmuştur(19). *H. pylori*den kaynaklanan gastrik enfeksiyon ve otoimmün pankreatit arasında bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. Özellikle anti CA II otoantikolarının AIP teşhisindeki önemi son yıllarda doğrulanmıştır.

Bu çalışmada, *H. pylori* enfeksiyonuna maruz kalmış kişilerin serumlarında, CA II otoantikolarının varlığı incelenecektir. Ölçümlerimiz daha önce laboratuvarımızda farklı otoimmün hastalıklarda anti CA II belirlenmesi amacıyla Ahmet Mentеше tarafından CA II için uyarlanan ELISA metoduyla gerçekleştirilecektir(30).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar

Otoimmünite, organizmanın kendi antijenlerine karşı kontrol edilemeyen cevabı sonucu oluşur (1). Son yıllarda büyüyen bir hastalık listesi otoimmüniteye bağlanmıştır. Otoantikorlar; hasar görmüş, antijenik olarak değişmiş dokulara cevap olarak gelişebilir.

Toleransın veya kendi antijenine cevapsızlığın önlenmesi ve otoreaktif lenfositlerin aktivasyonu otoimmün hastalıkların oluşmasındaki en önemli olaylardır. Bu olayın açıklamasını yapacak temel mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Diğer etiyolojik faktörler arasında, genetik yatkınlık ve sitokin aktivitelerinin yanı sıra virüsler de otoimmünitenin oluşumunda etkin rol oynarlar. Viral enfeksiyonun, bireyin kendisine toleransı kırdığı ve sonuçta özgül hücre veya dokuda harabiyet yapan bir seri reaksiyon başlamasına neden olduğu hipotezi birçok çalışmada benimsenmektedir (2).

Otoimmün hastalıklar, organa özgü otoimmün hastalıklar ve sistemik otoimmün hastalıklar olmak üzere ikiye ayrılır. Organa özgü otoimmün hastalıklar şunlardır:

1. Hashimoto tiroiditi
2. Otoimmun hemolitik anemi
3. Otoimmun atrofik gastrit
4. Otoimmun ansefalomyelit
5. Goodpasture sendromu
6. Otoimmun orşitis
7. İdyopatik trombositopenik purpura
8. İnsüline bağımlı diabetes mellitus
9. Myastenia gravis
10. Graves hastalığı
11. Primer bilyer siroz

12. Kronik aktif hepatit
13. Kilitis ülseroza
14. Membranöz glomerulonefrit

Organa özgü olmayan otoimmün hastalıklar şunlardır:

1. Sistemik lupus eritematozus
2. Romatoid artrit
3. Sjögren sendromu
4. Reiter sendromu
5. Polimyosit-dermatomyosit
6. Skleroderma (Sistemik sklerozis)
7. Poliarteritis nodoza

Edinsel (adaptif) immün cevabı oluşturan T ve B hücrelerinde, antijen tanıma özelliği rastlantısal yeniden düzenlemelerle (random rearrangements) belirlenir ve bu işlemler sırasında, organizmanın kendi (self, öz) antijenleri ile reaksiyon verme potansiyeli olan T ve B hücreleri de oluşur (3). Merkezi ve çevresel tolerans mekanizmaları ile, vücudun kendi antijenlerine yönelik olan immün yanıtının gelişimi engellenir veya kontrol altında tutulur.

Organa spesifik otoimmün hastalıklarda immün cevap, tek bir organ veya glandda bulunan hedef antijene yönelmiştir. Sıvısal veya hücresele immünite yolu ile oluşan tahribat ve klinik belirtiler bu organda görülür. Bu organın fonksiyonları uyarılır veya baskılanır. Sistemik otoimmün hastalıklarda ise otoantikolar pek çok antijene karşı oluştuğu için pek çok doku ve organda tahribat olabilir. Otoimmün hastalıkların oluşumunda bir çok faktör rol oynar. Bu hastalıkların kesin ve tek bir nedeni olmadığı için kesin tedavileri de yoktur (4). Otoimmün hastalıklarda immün sistemi düzenleyici, otoimmün cevabı baskılayıcı çeşitli ilaçlar kullanılır.

İmmün Tolerans

İmmün tolerans, kişinin spesifik bir antijene karşı immün cevap geliştirememesi durumu olarak tarif edilir (5). Self tolerans, kişinin kendi doku antijenlerine immün cevap verebilirliğinin bulunmadığını ifade eder. Sağlıklı kişilerde antiself reaktiviteyi üç önde gelen mekanizmanın önlediğine inanılır. Bunlar; klonal delesyon, klonal anerji ve periferik süpresyondur.

Klonal Delesyon (klonal silinme): Timustaki gelişimleri sırasında lenfositler, spesifik bir antijeni tanıyacak TCR' lerini rastgele gen düzenleme mekanizması ile kazanırlar. Bu rastgele gen düzenlenmesi sonucunda, yabancı antijenlere spesifik T hücrelerinin yanında, hem self-MHC moleküllerini tanımayan T hücreleri, hem de self antijenlere spesifik T hücreleri oluşur. İmmun sisteme yararı açısından, yabancı antijenlere spesifik T hücrelerinin olgunlaştırılarak sekonder lenfoid organlara gönderilmesi gerekir. Ancak, Self-MHC moleküllerini tanımayan T hücreleri immun yanıtta kullanılamayacaktır, dolayısıyla bunların vücuda hiçbir yararı olmayacaktır. Diğer taraftan, self antijenlere spesifik lenfositler eğer gelişirlerse vücudun kendi antijenlerine karşı immun yanıt oluşturacaklar, bu da vücuda zararlı olacaktır. Bu nedenlerle, vücuda yararı olmayan ve zararlı olacak lenfositlerin ortadan kaldırılması gerekir.

Klonal Anerji: Klonal Anerji, lenfositlerin antijenlerle belli şartlarda karşılaşmasıyla ortaya çıkan dönüşümsüz fonksiyonel inaktivasyonu ifade eder. Örneğin; antijen spesifik CD4+ hücrelerinin aktivasyonu iki sinyal gerektirir. Birincisi antijen sunan hücrelerin (APC) yüzeyindeki MHC Class II molekülleriyle birlikte peptid antijenin tanınması ve ikincisi APC'ler tarafından meydana getirilen 'yardımcı stimülatör faktörler' sinyal setidir. Eğer hücreler tarafından sunulan antijen gerekli ek stimülatörleri meydana getiremezse, negatif bir sinyal oluşur ve hücre anejrik hale gelir. Timusta gelişme sırasında timik APC'ler, ikinci sinyal oluşturmada başarısız olursa klonal T hücre anejjisi meydana gelebilir. Böylece timus self toleransta kritik bir rol oynar. Klonal anejji B hücrelerini de etkiler ve self antijenlere B hücre toleransı muhtemelen önde gelen mekanizmadır.

T Hücrelerinin Periferik Etkisi: Otoreaktif lenfositleri aktif olarak baskılayan hem hücresel, hem de humoral birçok faktör tarif edilmiştir. Bunlardan supresör T hücreleri, sitotoksik T hücreleri gibi CD8+ hücreleridir. Yapılan deneylerde hem yardımcı T hücrelerinin, hem de B hücrelerinin, supresör T hücrelerle inaktivasyonunun mümkün olduğu görülmüştür. Yaşam için otoimmünitenin önlenmesi çok hayatidir. Bu nedenle bizi koruyucularımızdan korumak için birçok mekanizma geliştirilmiştir. T hücrelerle self toleransın önde gelen mekanizması

otoreaktif klonların delesyonudur. Yardımcı T hücreler hem selüler hem de humoral immünite için kritik kontrol elemanları olduğundan, self reaktif T hücrelerin toleransı, otoimmün hastalıkları önlemede ileri derecede önemlidir. T hücre toleransına zıt olarak B hücre toleransı çokca klonal anerji ile devam ettirilir. Klonal anerji veya delesyon bariyerlerinden “kaçamak” yapan lenfositler (hem T hem de B lenfositler) baskılayıcı mekanizmalarla baskılanır.

Self toleransın bir veya daha fazla mekanizmasının yok olması, dokuları immünolojik saldırıya mağruz bırakır ki bu durum otoimmün hastalıkların gelişimine neden olur. Her ne kadar doku hasarını geliştirmede immünkompetan hücreler kesinlikle rol alıyorsa da, selfe karşı reaksiyonları başlatan başlıca etkileri bilmiyoruz. Fakat genetik faktörler ve infeksiyonların (bakteriyal-viral) önemli olduğu düşünülmektedir.

2.2. *Helicobacter Pylori*

Helicobacter pylori enfeksiyonu, dünyada en sık rastlanan gastrointestinal bakteriyel hastalıktır (6). Bu mikroorganizma, vücuda bir kez girdiğinde, tedavi edilmediği takdirde ömür boyu varlığını devam ettirmektedir. Gastrit, duodenit ve peptik ülser oluşumunda da rol oynadığı gösterilmiştir (7).

Günümüzde kronik aktif gastritin etiyolojik ajanı, peptik ülser hastalığında olguların çoğundan sorumlu faktör, mide kanseri ve MALT-lenfomasında ko-faktör olarak kabul edilen *H.pylori*'nin gelişimi şöyledir(7).

Ortaçağa ait çok eski tıbbi kayıtlarda peptik ülser komplikasyonlarından söz edilmesine rağmen, ilk kez 1586'da bir İtalyan doktor tarafından rapor edilmiştir.

Bunu takiben 1688'de İsviçre'de Johannes Von Muralt bir otopside duodenal ülseri tespit etmiştir. Onsekizinci ve 19. yüzyıllarda, midede hidroklorik asit ve sekresyonunun sindirimle ilgili özelliklerinin tanımlanması ile, üst gastrointestinal sistemin fonksiyonları daha iyi anlaşılmıştır. Ondokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında gastrik cerrahinin gelişimi ile üst gastrointestinal hastalıkların tanısında daha başarılı olunmaya başlanmıştır (7).

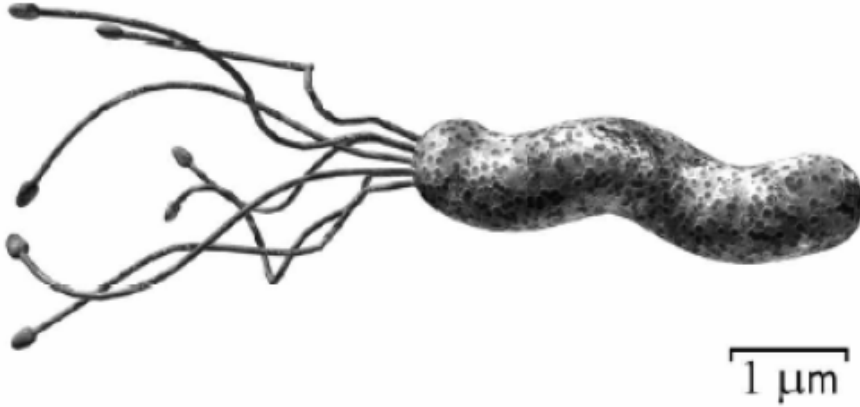
İtalyan patalog Bizzozero köpeklerin midesinde spiral bakterilerin varlığını 1893'te tanımladıktan sonra benzer bulgular kedi ve fare midelerinde tespit edilmiştir. Liebre ve Lefevre 1959 yılında, tetrasiklin tedavisi sonrası midede üreaz aktivitesinin kaybolduğunu görerek, bu enzimin bakteriyel kaynaklı olduğunu ileri sürdüler. Delluva, 1968'de "germ-free" hayvanların midesinde üreaz bulunmadığını, bu enzimin bakteriyel kaynaklı olduğunu ortaya koydu . Mikrobiyologlar midenin steril olduğunu 1960-1970 yılları arasında, düşündükleri için daha önce yapılan çalışmaları değerlendirmedikleri gibi, yaptıkları çalışmalarda mikroskopik incelemeye yer vermediklerinden bu spiral bakteri farkedilemedi (7). Steer ve Colin-Jones,1975 yılında gastrik ülserli hastaların %80'inde gram negatif spiral organizmayı tespit ettiler, ancak kültürde üretmeyi başaramadılar (29).

Bu bakteri 1982 yılında bulunana kadar, stres ve yaşam biçiminin ülser hastalığının en önemli nedeni olduğu sanılırken, bugün duodenal ülserlerin % 90, gastrik ülserlerin ise %80'den fazlasının nedeninin *H.pylori* olduğu bilinmektedir. Her ne kadar gastrik ülser üretimi baskılandığında ülserler iyileşse de, sık tekrarlamaları bu bakterinin önemini göstermektedir ve bakterinin tedavi edilmesi hastalık tam bir tedavi şansına kavuşmuştur. Nobel Tıp Ödülü 2005, gastrit ve peptik ülser hastalıklarına *H. pylori* adlı bakterinin neden olduğunu bulan Avustralyalı bilim adamları B.J Marshall ve J.R Robin'e verildi.

Helicobacter pylori, gram negatif, kıvrık çomak, spiral veya S şeklinde görülebilen, mikroaerofilik bir bakteridir. Bakterinin uzunluğu 2-4 µm olup, genişliği 0.5-0.9 µm arasında değişmektedir. (Şekil 1)

***Helicobacter Pylori* ve Ülser**

Peptik ülser, asit mide suyunun etkisiyle mide, bağırsak kanalının herhangi bir yerinde mukozada meydana gelen en az muskuler tabakaya kadar uzanan sınırları belli doku kaybıdır (9). Duodenal ve gastrik ülser olmak üzere ikiye ayrılır. *H.pylori* enfeksiyonunda inflamasyon korpusta belirgin ise gastrik, antrumda yüksek aktiviteli inflamasyon varsa duodenal ülser ortaya çıkmaktadır. Duodenal ülseri olanların % 60-90'ında *H.pylori* pozitifdir. Gastrik ülserliler de ise bu oran % 44 olup daha düşüktür.



Şekil 1. *H.pylorinin* üç boyutlu görünümü

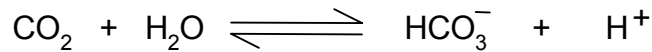
***Helicobacter Pylori* ve Gastrit**

Gastrit, mide mukozasının akut veya kronik iltihabi reaksiyonudur (8). Antrum ve korpus mukozasındaki kronik aktif gastritler hemen daima *H.pylori* ile birlikte. Akut gastrit, belirli bir nedene bağlı, ani olarak ortaya çıkan ve etkenin uzaklaştırılması ile hızla düzelen geçici iltihabi durumu yansıtır (28). Kronik gastrit ise yüzeysel bir fazla başlayan ve atrofik fazla sonlanan dinamik bir olaydır. *H.pylori* eradikasyon tedavisi ile gastritte iyileşme görülür.

2.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik Anhidraz (CA, E.C 4.2.1.1, Karbonik Hidroliyaz) mikroorganizmalardan yüksek yapıllı hayvanlara kadar dağılımı olan bir enzimdir. Aktif bölgesinde Zn iyonu ihtiva eden bir metaloenzimdir. Karbonik Anhidrazın bilinen yegane fizyolojik fonksiyonu, CO₂'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizlemesidir (10).

Hücrelerde oluşan CO₂, kana geçtiği zaman eritrositler içine alınır. Eritrositler içinde CO₂, karbonik anhidraz enziminin etkisiyle H₂O ile birleşir.



Yukarıdaki reaksiyonda ortaya çıkan hidrojen iyonları hemoglobin molekülüne bağlanır, bikarbonat iyonları ise eritrositlerden plazmaya çıkar ve akciğerlere kadar plazmada gelir(11). Kan akciğerlere gelince, bikarbonat iyonlarının eritrositler içine girmesi ile reaksiyon tersine döner, sonuçta su ve karbondioksit oluşur ve solunum yoluyla dışarı atılır. Karbondioksitin % 70 i bu yolla taşınır. Karbondioksitin bir kısmı doğrudan hemoglobin molekülüne bağlanarak taşınır. Çok az bir kısmı plazmada fiziksel olarak çözülmüş halde taşınır. Az bir kısmı da plazma proteinleri ile aminokarbon bileşikleri oluşturarak taşınır. Bu reaksiyon aracılığıyla asit-baz dengesi, membranlardan sıvı ve iyon transportu,üre ,yağ asitleri ve pirimidin nükleotidlerinin sentezi, mide asit salgısı, sindirim, üreme, kemik metabolizması, nöronal aktivite ve beyin omirilik sıvısının regülasyonu gibi birçok olaya katılırlar. Ayrıca glukoneenez, ürogenez ve lipogeneze de önemli rol oynarlar (11) .

Canlılarda 5 tane farklı bilinen yapısal CA ailesi vardır.Bunlar α , β , γ sınıfı ve yakın zamanda bulunan δ ve ϵ türleridir.Bunlardan en fazla bilineni alfa ailesidir.İnsan patojenlerinde de (örneğin; *Helicobacter pylori*, *plasmodium falciparum*) yapısal olarak benzeyen izoenzimleri mevcuttur (13).

Memelilerde bulunan alfa tipi CA'ların doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı on beş ayrı (CA I-XV) izoenzimi tarif edilmiştir (12).Bunlardan CA I,II,III,VII ve XIII sitoplazmada, IV,IX ,XII, XIV ve XV'ler membran bağımlı, V mitokondride, VI tükürük salgısında, diğerleri 3 CA ilişkili proteinler olan (CARP) VIII, Xve XI'de sitozolde yer alır.

CARP'ların aktif bölgelerinde kritik histidin rezüdüleri eksik olduğundan enzimatik aktiviteleri eksiktir.En son tanımlanan CA XV ilk defa 2000 yılında Hewett-Emnett tarafından genetik çalışmalar sırasında bulunmuştur (11). Rekombine fare COS-7 hücrelerinden ve Escherichia coli bakterisinden izole edilmiştir. Enzimatik aktifliği CA IV ile benzerlik göstermektedir. Farelerin beyin,böbrek ve testislerinden izole etmek mümkündür.CA XV'in katalitik aktivitesi düşük ve enzimatik aktivitesi için disülfid köprülerinin doğru konformasyonu önemlidir. CA XV alfa-CA gen ailesinin ilk üyesidir. Şempanzeler ve insanlar hariç birçok türde eksprese edilebilir (12).

2.4. CA ve Otoimmünite

2.4.1. CA II ve Otoimmün Hastalıklar

CA II, alfa sınıfı CA ailesinin katalitik aktivitesi en yüksek olan üyesidir. Katalitik etkisi aktif bölgesindeki çinko iyonlarının 3 histidin rezüdüleriyle koordinasyonu ile gerçekleşir(16). Kataliz sırasında çinko iyonları nükleofilik Lewis asidi gibi görev yaparlar. CA II, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, eritrositlerde, mide mukozasında ve beyinde bulunur. CA II, ayrıca safra kesesinin epitel hücrelerinde, pankreas kanallarında ve böbreğe ait tükrük bezlerinden ekprese edilmektedir.

CA II otoantikörlerinin spesifik değil de spesifik olmayan otoimmünitenin bir işaretleyicisi olduğu düşünülmektedir (17) . “Otoimmün hastalıkların gelişmesinde patolojik faktördür. İlk kez 1991 yılında Inagaki ve arkadaşları tarafından Sjögren sendrom (SS)’lu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir (16). Gordon ve arkadaşlarının 1995’te yaptığı çalışmada CA II otoantikörleri PBC (Primer biliary cirrhosis)’de ve otoimmün pankreatitli hastaların serumlarında bulunmuştur (18). CA II’nin ekzokrin salgı sisteminde önemli olduğu ve birçok otoimmün hastalığın patogeneğinde önemli rol oynadığı bulunmuştur (13). Örneğin CA II otoantikörleri, Primer Biliyer Siroz(PBC) ve Otoimmün kolanjiti (AIC)’yi ayıran serolojik bir göstergedir. Anti CA II otoantikörlerinin AIP(otoimmün pankreatit) teşhisinde önemi son yıllarda doğrulanmıştır (14) .

Otoimmünitenin mikrobiyal tetiklenmesi teorisi yıllar önce ortaya atılmış ve bu teori spesifik enfeksiyonlar esnasında veya hemen sonrasında bazı otoimmün hastalıkların sıklığının artışıyla ilgili gözlenen epidemiyolojik bulgular üzerine kurulmuştur (19) . Ancak son yıllarda, genetik yatkınlığın olmadığı durumlarda, insan ve mikrobiyal antijenler arasındaki moleküler benzerliklerin, otoimmün hastalıkların tetiklenmesinde önemli rolü olduğu gözlenmiştir. Otoimmünitenin gelişmesiyle dokularda hedef antijenlerin özel çoğaltımı, otoimmün reaksiyonların gelişmesine sebep olmuştur. Tam olarak sebebi bilinmese de otoimmün reaksiyonların

gelişmesinde CA II otoantikörlerinin, hedef antijenlerin çoğaltılmasıyla otoimmün reaksiyonların aydınlatılmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir.Öte yandan bazı araştırmacılar da, oluşan otoantikörlerin CA II'ye karşı oluşmadığı, moleküler benzerlikten dolayı farklı bir antijene karşı üretilmiş antikörün CA II ile çapraz reaksiyon verdiğini ileri sürmüşlerdir (19).

2.4.2. *Helicobacter Pylori* ve CA II Otoantikörleri

Helicobacter pylori enfeksiyonu, midede ülser oluşumu ve gastrik otoimmüniteyle ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur(21). *H. pylori*'li hastaların gastrik mukozasından eksprese edilen bazı antijenler otoantikörlerle tepki gösterir (20). *H. pylori*, S.S, PBC, AIP ve HCV (hepatit C virüs) ilişkili karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olduğuna dair çalışmalar da yapılmıştır. *H. pylori* enfeksiyonunun immün pankreatiti tetikleyebileceği ve bunun insan ve bakteri kaynaklı antijenlerin moleküler benzerlikleri de dahil olmak üzere ortaklaşa mekanizmalarla olabileceği öne sürülmüştür (22).

Yapılan çalışmalarda insan ve bakteri proteinlerinden çapraz reaktivite potansiyeline sahip olanların aminoasitlerin dizilişleri karşılaştırılmıştır ve insan CA II ve *Helicobacter pylori* alfa-CA (HpCA) izoenzimleri arasında anlamlı bir homoloji bulunmuştur (23).

H. pylori'de karbonik anhidrazın alfa ve beta olmak üzere iki farklı izoenzimi vardır ve bunlardan alfa izoenziminin CA II ile olan benzerliği şaşırtıcıdır.(alfa CA bakteri dış yüzeyine bağlı olduğundan bunun konak immünite için antikörle etkileşme açısından ideal bir haldedir). Alfa HpCA, bakterinin gastrik kolonizasyonda ve gastrik çevredeki asitli ortama intibak için gereklidir (24) . Bunun sonucu olarak da *H. pylori*'nin yaşaması ve çoğalması için gerekli adaptasyonu sağlar. Bu nedenle HpCA inhibisyonunun, *H.pylori*'nin ilaç direncini yönlendiren yeni bir farmokolojik yöntem olabileceği düşünülmektedir(25).Yapılan deneylerden elde edilen bilgilere göre, alfa HpCA izoenziminin asidik ortamda anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (27).

Aynı sonuç, etkili karbonik anhidraz inhibitörü olan asetozolidli ortamda kültür yapılmasıyla da gözlenir(26). Bütün bu sonuçlar bulunan in siliko bilgilerle birbirini tamamlanmış ve AIP'da *H. pylori* tetiklenmesinin mümkün olabileceğini gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri üreticileri ile birlikte Tablo 1’de listelenmiştir.

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
ELISA yıkayıcısı	Diagnostics Pasteur LP 35
ELISA okuyucusu	Spektraflour plus, TECAN
ELISA pleyti	Coostar, yüksek bağlamam kapasiteli
Etüv	Gallenkamp
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 0.5-10 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 10-100 µL	Socorex
Otomatik pipet, 50-200 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Transferpette
Otomatik pipet, 1-5 mL	Exelpette
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Soğutucu	Philco FRT 152 D
Spektrofotometre	Shimadzu, UV – 1601
Vorteks karıştırıcı	Nüve, NM 110

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Tablo 2’de bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri verilmiştir.

Tablo 2. Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı
Disodyummonohidrojenfosfat (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Merck, A547474
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck, absolute, d=0.790-0.793 (100986)
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Merck, % 30, d=1.11 (1.08597)
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, % 37, d=1.186 (7647-01-0)
Sığır serum albumini (BSA)	Sigma (P6529)
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck, > % 99.5 (6329)
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma, lot 2029A
İnsan CA II izoenzimi	Sigma
Tween-20	Sigma, %10, P8942
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merk, 646 A-153371
Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human Ig G antikoru	Sigma, A-8792, Lot 103K4848
Sitrik asit (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	Sigma, C-1909, Lot 47H0808
Ortho-phenylene-diamin tabletleri	Sigma, P-1063, Lot 092K8205
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Carlo-Erba, %96, (d=1.84 g/ml) no: 306657
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.)	Merck, (6345)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, > % 99 (6462)
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, % 99.5-100.5 (1.06400.1000)
Potasyum klorür (KCl)	Merk, %99-100.5 (711 TA299855)
Anti-human Ig G antikoru	Sigma,

Kullanılan çözeltiler ve bazılarının hazırlanışlarıyla kullanıldığı yerler liste halinde Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Kullanıldığı Yer ve Hazırlanışı
1 M NaOH	10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı.
1 M HCl	Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
Kaplama Tamponu (PH:9.6)	Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı A çözeltisi: 0,2 M Na ₂ CO ₃ (2,12 g / 100ml), B çözeltisi: 0,2 M NaHCO ₃ (1,68 g/ 100ml), 8mL A çözeltisi ve 17mL B çözeltisi distile su ile 100mL'ye tamamlandı. pH: 9,6'ya ayarlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.
Birinci Yıkama Tamponu (PBS çözeltisi)	0,14 M (0,8 g) NaCl, 2,7 mM (0,02 g) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH ₂ PO ₄ ve 8,1 mM (0,2169 g) Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O tartılıp bir miktar distile suda pH: 7,4'e NaOH ile ayarlandı.Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
İkinci Yıkma Tamponu (Tween-20 – PBSçözeltisi)	0,14 M (0,8 g) NaCl, 2,7 mM (0,02 g) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH ₂ PO ₄ ve 8,1mM (0,2169 g) Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O tartılıp bir miktar distile suda pH: 7,4'e NaOH ile ayarlandı. 50µL tween-20 eklendi.Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
Bloklama Tamponu	%3 bovin serum albumin ihtiva eden birinci yıkama tamponu PBS çözeltisi. 3g BSA 100mL PBS'de çözülerek hazırlandı.
2M Sülfürik asit çözeltisi	Reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.
Sitrat-fosfat tamponu (pH: 4.8)	0,1 M (2,101 g) Sitrik asit (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O), 0,2 M (3,12g) Sodyum hidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O) alınır. Distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. pH 4,8'e ayarlanır. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.
Substrat çözeltisi	10 mg orto-phenylene-diamine pH: 4,8 olan sitrat-fosfat tamponunun 25 ml'sinde çözülür. Kullanılmadan hemen önce çözeltiliye 10µL, %30'luk hidrojen peroksit ilave edilir.
Antikor(konjugat) çözeltisi	5 µL Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikoru alınır ve seyreltme tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.

3.3. Numunelerin Toplanması

Çalışmamızda kullanılan serumlar K.T.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Y. Doç. Dr. Neşe Kaklıkkaya tarafından daha önce çalışma amacıyla, tanıları bir Gastroenteroloji uzmanınca konulan hastalardan ve kontrol grubunu oluşturmak amacıyla sağlıklı kişilerden toplanmıştır. Hastalıklara ve *H. pylori*

varlığına göre toplanan serumların dağılımı aşağıdaki tabloda verilmiştir. Gruplar oluşturulurken kadın erkek ayrımı yapılmamıştır. Elde edilen serumlar çalışma yapılana kadar -20 C'de saklandı. Hemolizli kanlarda CA II seruma bol miktarda geçeceğinden dolayı numune toplanmasında bu hususa azami dikkat gösterildi.

Tablo 4. Çalışma gruplarının yaş aralıkları ve cinsiyet dağılımı

Gruplar:	1.Kontro 1	2. <i>H.pylori</i> (-) ülser	3. <i>H.pylori</i> (-) gastrit	4. <i>H.pylo</i> <i>ri</i> (+) ülser	5. <i>H.pylori</i> (+) gastrit
Yaş aralıkları	19 - 66	22 - 65	25 - 67	25 - 70	24 - 68
Cinsiyet (K/E)	19/11	13/17	16/14	13/17	10/20

3.4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Çalışma gruplarındaki bireylerin CA II otoantikör seviyelerini belirlemek için Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yöntemi küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı(17,30). Her bir numune için ölçümler iki kez tekrarlandı.

Deneyin Yapılışı

1. ELISA pleytindeki mikrotiter kuyucuklar kaplama tamponunda (pH: 9,6) seyreltilen ve kosantrasyonu 10 µg/mL olan CA-II'nin 50 µL'si ile kaplandı ve 18 saat +4 °C'da inkübasyona bırakıldı (kaplama yapılırken her serum örneği için 4 kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi CA-II ile kaplanır, ikisi kaplanmaz. Sonuçlar değerlendirilirken kaplı olan kuyucukların absorbans değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbans değerleri çıkartılır).

2. Pleyt PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile 5'er dakika arayla (bu aralarda pleytler çalkalayıcıda çalkalandı) 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi şu şekilde yapıldı: Önce ELISA yıkayıcısında pleyt bir kez yıkandı ve ardından sekizli pipetle 200 µL yıkama tamponu kuyucuklara pipetlendi ve çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandı ve ardından ELISA yıkayıcısında yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

3. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara 200 µL bloklama tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

4. Bloklamamanın ardından Pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

5. Sonra hasta (30'ar *H.pylori* (+) gastrit ve ülser, 30'ar *H.pylori* (-) gastrit ve ülser birey) ve kontrol (30 sağlıklı birey) serumları %1 BSA ihtiva eden seyreltme tamponunda 1/200 oranında seyreltildi ve her bir seyreltilmiş serum örneği 2 kuyucuk CA-II kaplanmamış ve 2 kuyucuk CA-II kaplanmış olmak üzere toplam 4 kuyucuğa ayrı ayrı 100 µL pipetlendi ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

6. Pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

7. Kuyucuklara 100 µL %1 BSA ihtiva eden seyreltme tamponuyla 1/2000 oranında seyreltilmiş antikor (rabit anti-human Ig G antibody conjugated with horseradish peroksidase) ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bekletildi.

8. Pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile kinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı

9. 100 µL substrat çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 25 dakika karanlıkta bekletildi.

10. 2M H₂SO₄'in 100 µL'si bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusunda 485 nm'de renk okundu.

CA II kaplanmış kuyucuklardan okunan absorbanların ortalamasından CA II kaplanmamış kuyucukların ortalaması çıkarılarak sonuçlar elde edildi.

3.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Hasta gruplarının ve kontrol grubunun ortalamaları X ve standart sapmaları S.D hesaplandı. Önce Kolmogorov-Smirnov Testi yapıp, değerlerin normal dağılıma uyup uymadığına bakıldı. *H.pylori* (+) grubu uymadığı için nonparametrik test, 5'li grupların karşılaştırması için Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı. Normal dağılıma uyanlara Student's T Testi, uymayanlara Mann Whitney U Testi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. ELISA Sonuçları

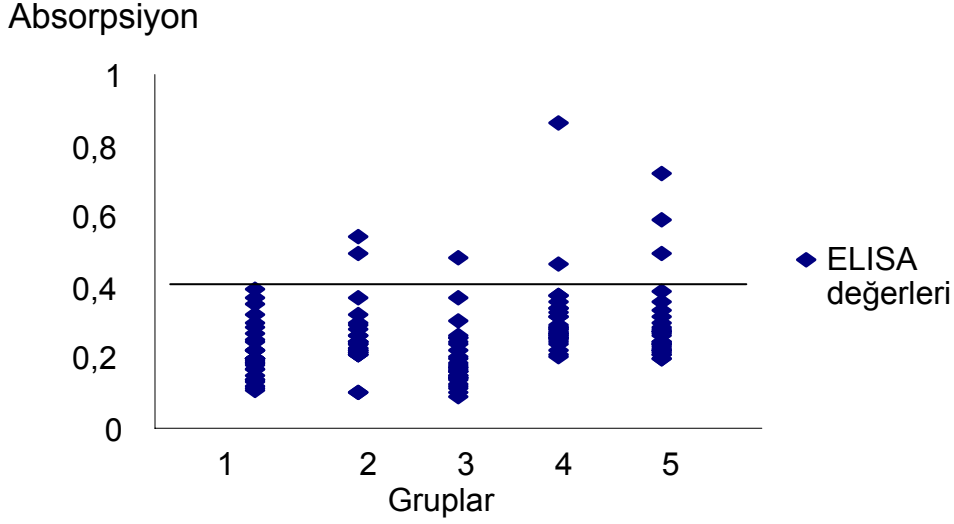
ELISA metoduyla 30 kontrol, 30 *H.pylori* negatif ülser, 30 *H.pylori* negatif gastrit, 30 *H.pylori* pozitif ülser, 30 *H.pylori* pozitif gastrit hasta bireylere ait serumlar incelenmiş ve saf insan CA II'sine karşı CA II otoantikörlerinin bağlanmaları ölçülmüştür. Ortalama absorbans değeri $> 0,437$ olan serumların reaksiyonu pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu değer kontrol grubuna ait serumların ortalama absorbans değerine ($X=0,212$), 3 S.D değeri ($0,225$) eklenerek hesaplanmıştır. Diğer gruplara ait ($X\pm S.D$) değerleri **Tablo 5**'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışma gruplarına ait ortalama CA II absorbans ve \pm SD değerleri

Gruplar:	1.Kontrol	2. <i>H.pylori</i> (-) ülser	3. <i>H.pylori</i> (-) gastrit	4. <i>H.pylori</i> (+) ülser	5. <i>H.pylori</i> (+) gastrit
(Ortalama	0,212	0,253	0,192	0,307	0,291
\pm SD)	$\pm 0,075$	$\pm 0,088$	$\pm 0,083$	$\pm 0,119$	$\pm 0,119$

Kontrol grubuna ait cut off değerine göre, grup1: kontrol grubu 0 , grup 2: *H.pylori* negatif ülser grubunda 2 (% 6,6), grup 3: *H.pylori* negatif gastrit grubunda 1(%3,3), grup 4: *H.pylori* pozitif ülser grubunda 2 (%6,6) ve grup 5: *H.pylori* pozitif gastrit grubunda ise 3 (%10) pozitif sonuç bulunmuştur.Belirtildiği üzere kontrol grubunda pozitif sonuçlara rastlanmamıştır (**Şekil 2**).

Yapılan istatikselsel analizlere göre kontrol / *H.pylori*(+) gastrit (p=0,001), kontrol / *H.pylori* (+) ülser (p=0,0041), *H.pylori*(-) gastrit / *H.pylori* (+) gastrit (p=0,0038), *H.pylori* (+) ülser / *H.pylori* (-) ülser (p=0,048) ve *H.pylori* (+) gastrit ve *H.pylori* (+) ülser grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı derecede fark bulundu. Gruplar arası farklılığın önem derecesini gösteren tablo aşağıda verilmiştir (**Tablo 6**).



Şekil 2. Serumlarında CA II otoantikörleri bulunduran gruplar ve sağlıklı bireylere ait serum absorbands değerleri. Kontrol grubuna ait $X \pm 3SD=0,437$ cut off değeri olarak alınmıştır.

Tablo 6. Gruplar arası farklılığın önem derecesi (* istatistiksel yönden önemli)

Gruplar	
Kontrol / <i>H.pylori</i> (-)gastrit	p=0,980
Kontrol / <i>H.pylori</i> (-) ülser	p=0,062
Kontrol / <i>H.pylori</i> (+)gastrit	*p=0,001
Kontrol / <i>H.pylori</i> (+)ülser	*p=0,00041
<i>H.pylori</i> (+)gastrit/ <i>H.pylori</i> (-) gastrit	*p=0,00038
<i>H.pylori</i> (+)ülser/ <i>H.pylori</i> (-)ülser	*p=0,048
<i>H.pylori</i> (+)gastrit/ <i>H.pylori</i> (+)ülser	p=0,104

5. TARTIŞMA

CA II insan dokularında en yaygın olarak bulunan karbonik anhidraz izoenzimlerinden olup, CO₂'nin hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyerek vücutta asit-baz dengesinin ve birçok reaksiyon için substrat olarak gerekli olan bikarbonatın sağlanmasında, kardiyovasküler tonusun regülasyonunda ve hücre bölümleri arasındaki iyon değişiminin kontrolünde rol alır (11). Otoantikolar; hasar görmüş, antijenik olarak değişmiş dokulara cevap olarak gelişebilir. İlk kez 1991 yılında Inagaki ve arkadaşları tarafından otoimmün hastalıklardan olan sistemik lupus eritematos ve Sjögren's sendrom'lu hastaların serumlarında CA II otoantikoları bulunmuştur(16). Bir sitoplazma enzimi olarak CA II'nin otoantikolarının otoimmün hastalıklarda gözlenen hücre hasarına nasıl sebep oldukları açıklanamamıştır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda otoimmün bir hastalık olan otoimmün pankreatit(AIP)'li kişilerin serumlarında çoğu kez CA II otoantikolarının bulunması, bu hastalığın teşhisinde anti CA II pozitifliğinin kriter olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir. Ayrıca, F. Guarneri ve ark.(19), daha önce *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna maruz kalmış ve genetik olarak yatkın bazı kişilerde AIP görülmesinden ve AIP-anti CA II birlikteliğinden yola çıkarak, tamamen bilgisayar ortamında(*in silico* metod), *H. pylori* α -hpCA enzimi ile CA II arasında büyük miktarda bir homoloji belirlemiş ve α -hpCA antikolarlarının anti CA II'ye benzer otoimmün etkiler sergileyebileceğini bildirmişlerdir(19).

Bu çalışmada, F. Guarneri ve ark. *in silico* metodlarla elde ettikleri bulgulara göre ileri sürdükleri hipotezin, *H. pylori* enfeksiyonlu kişilerin serumlarında, *in vitro* testinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu maksatla her biri gastroenteroloji uzmanı tarafından değerlendirilmiş olan 30 kişiden ibaret 5 çalışma grubu oluşturulmuştur: 1. grup muayenesinde mide problemi belirlenememiş sağlıklı, 2.grup ülser teşhisi konulup, *H.pylori* tespit edilemeyen(*H.pylori* (-) ülser), 3. grup *H.pylori* (-) gastritli, 4.

grup *H.pylori* (+) ülserli ve 5. grup *H.pylori* (+) gastritli kişilerden ibarettir. Gruplar oluşturulurken kadın-erkek ayırımı yapılmazken, yaş ortalamaları yakın alınmıştır.

Çalışma gruplarındaki bireylerin CA II otoantikör seviyelerini belirlemek için Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yöntemi küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (17). Bu metodun CA II antikörlerinin tayinine uyarlanması, modifikasyonları ve sonuçlarının analitik değerlendirilmesi, daha önce laboratuvarımızda farklı otoimmün hastalıklarda antiCA II ölçümü için Ahmet Mentеше tarafından gerçekleştirilmiştir (30). ELISA ile CA II otoantikörlerinin ölçümünün yapıldığı çalışmalar incelendiğinde, ELISA pleytlerine kaplanan CA II konsantrasyonları, serum dilüsyonları, kullanılan bloklama tamponları, konjuge antikörün cinsi ve inkübasyon süreleri arasında ciddi farklılıklar gözlenmektedir. Araştırmamızda Hosoda ve arkadaşları tarafından kullanılan ELISA yönteminden farklı olarak çalışmamızda Tris-HCl tamponu yerine PBS kullanılmıştır. Ayrıca +4 C'de birer gece bekletilerek gerçekleştirilen bloklama ve numune uygulanması yapılmıştır. Bunun dışında kaplamada kullanılan CA II'nin konsantrasyonuna, konjuge antikörün cinsi, miktarı ve dilüsyonuna, renk reaktifine ve inkübasyon sürelerine bağlı kalınmıştır (29).

ELISA işleminden elde edilen değerlerin grup içi ortalamaları ve standart sapmaları **Tablo 5**'te verilmiştir. Sonuçların pozitiflik değerlendirilmesinde kullanılacak cut-off değeri kontrol grubundaki ortalamaya göre $X \pm 3S.D = 0,437$ olarak uygulanmış çünkü 3 S.D üzerinden değerlendirme yaptığımızda kontrol grubunda pozitif değer çıkmamış ve bu da yöntemin güvenilirliğini artırmıştır. Gruplardaki sonuçlar bir arada grafik üzerinde gösterilmiştir (**Şekil 2**). Bu tablo ve grafikte *H.pylori* (+) gastrit grubunda 3 (%10), *H.pylori* (+) ülser grubunda 2 (% 6,6), *H.pylori* (-) gastrit grubunda 1 (%3,3), *H.pylori* (-) ülser grubunda 2 (%6,6) olmak üzere toplam 8 (%5,3) pozitif sonuç görülmektedir. Burada, *H.pylori* enfeksiyonu belirlenen 60 kişiden yalnız 5'inin(% 8,3) serumlarında uyguladığımız ELISA yöntemiyle CA II antikörlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu rakam düşük bir hassasiyeti gösterdiğinden, kontrol grubunda hiç pozitiflik olmamasından kaynaklanan yüksek spesifikliğe rağmen, ELISA yöntemiyle CA II antikörlerinin serumda ölçümünün *H.pylori* enfeksiyonunda bir belirteç

olamayacağı kanaatine varılmıştır. Burada *H.pylori* (-) gastrit grubunda 1 ve *H.pylori* (-) ülser grubunda 2 pozitif sonucun bulunması bu gruptaki bazı hastaların tedavi edilmiş bir *H.pylori* enfeksiyonu geçirmiş olmalarından kaynaklanabilir.

Tablo ve grafikteki değerler üzerinde gerçekleştirilen daha ileri seviye istatistiksel analizler neticesinde, kontrol grubuyla *H.pylori* (+) gastrit ve ülser grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur(sırasıyla, $p=0,001$ ve $p=0,00041$). Daha önceden bu konuyla ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından sonuçlarımızın karşılaştırılması yapılamamıştır. Ancak, kontrol grubuyla yapılan mukayeselerde, *H.pylori* enfeksiyonlu ülserli kişilerde gastritli olanlara nispeten daha önemli anti CA artışı görülmektedir ve bu fark da ülserlerde daha ileri seviyede *H.pylori* tahribat ve yerleşiminin olmasından kaynaklanmaktadır. Aynı şekilde, *H.pylori*(+) gastrit ile *H.pylori*(-) gastrit grupları ve *H.pylori* (+) ülser ile *H.pylori* (-) ülser grupları arasında da istatistiksel olarak önemli farklılıklar elde edilmiştir (sırasıyla, $p=0,00038$ ve $p=0,048$).

Yukarıda ifade edilen farklılıklar beklentilerimizi doğru çıkarmıştır. Yani, *H.pylori* enfeksiyonu belirlenen hastaların serumlarında CA II antikoru artışına rastlanmıştır. Ancak, burada artmış olan bizzat CA II antikoru değil de *H.pylori* 'ye ait alfa hpCA'nın antikoru da olabilir. Çünkü, CA II otoantikoruğunun otoimmün hastalıkların patolojisinde kesin rolü bilinmemektedir. Enfeksiyonlar otoimmünitenin tetiklenmesinde önemli çevresel faktörlerdir. *H. pylori* enfeksiyonunun da otoimmün bir hastalık olan AIP'yi tetiklediği daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Virüsler ve mikrobiyal ajanların sebep olduğu doku yıkımlarına bağlı olarak spesifik enzimlere karşı moleküler taklit, çapraz bağlanmalar, otoreaktif T hücrelerinin aktivasyonu ve adjuvant etkisi gibi mekanizmalarla antikor oluştuğu bilinmektedir. Benzer mekanizmalarla *H.pylori*li hastalarda CA II'ye karşı antikor oluşturulmuş olabilir. İnsan CA II'sinin humoral ve hücre aracılıklı immün reaksiyonlarını indükleyerek antijenik özellik gösterdiği çeşitli fare ırklarında otoimmün hastalıklar oluşturularak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalardan anlaşıldığı gibi otoantikoruğunun oluşumunda genetik faktörler de belirleyicidir. F.Guarneri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CA II ve alfa hpCA'nın HLA'ya bağlanma bölgesi motiflerinden DRB1*0405 üzerinde

paylaşılan segmentlerde anlamlı homoloji bulmuş ve bunun AIP için risk faktörü olduğu öne sürmüşlerdir. Bu bulgular da insan ve bakteri proteinlerinde paylaşılan segmentlerde bulunan HLA DRB1*0405 genotipinin AIP ile ilişkili olduğu fikrini kuvvetlendirmiştir. Bu genotip üzerinde ileride yapılacak çalışmalar immün kaynaklı hastalıkların aydınlatılmasında yardımcı olabilir. Ayrıca bulunan pozitif sonuçlarda CA II otoantikorlarının gözlenmesinde, *H. pylori*deki pozitifliğin ve HLA tiplerinin de katkısı olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Karbonik anhidrazın *H.pylori*'de alfa ve beta olmak üzere iki farklı izoenzimi vardır ve bunlardan alfa hpCA'nın insan CA II'si ile önemli derecede homoloji bulunmaktadır. Alfa hpCA bakteri dış yüzeyine bağlı bulunduğundan bu konak immünite için antikorla etkileşme açısından ideal bir hal oluşturur ve organizma bunun için kolayca antikor üretebilir. Alfa hpCA'nın insan CA II'si ile benzerliği dolayısıyla ELISA pleytindeki kaplanmış CA II'ye alfa hpCA antikorları da çapraz bağlanma yapabileceğinden daha yüksek CA II antikor seviyeleri bulunabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, kontrol (n=30), *H.pylori* (+) gastrit (n=30), *H.pylori* (-) gastrit (n=30), *H.pylori* (+) ülser(n=30) ve *H.pylori* (-) ülser(n=30) olmak üzere 150 kişilik çalışma grubunda ELISA yöntemiyle CA II otoantikörlerinin varlığı araştırıldı ve şu sonuçlar bulundu:

1. Bu çalışmada, Fabrizio Guarneri ve arkadaşlarının in siliko metodlarla elde ettikleri bulgulara göre ileri sürdükleri hipotezin, *H. pylori* enfeksiyonlu kişilerin serumlarında, in vitro testinin gerçekleştirilmiştir.
2. Kontrol grubunun cut off değeri <0,437 olmak üzere *H.pylori* (+) gastrit hasta grubunda 3 (%10), *H.pylori* (+) ülser grubunda 2 (%6,6), *H.pylori* (-) gastrit grubunda 1(%3,3) ve *H.pylori* (-) ülser grubunda 2 (%6,6) olmak üzere 8 pozitif değer bulundu.
3. 60 hastalık *H.pylori* enfeksiyonu tespit edilen kişilerin serumlarında toplam 5 pozitif sonuç gözlenirken, bu miktar % 8,3'lük bir hassasiyete karşılık geldiğinden, ELISA yöntemiyle CA II antikörlerinin serumda ölçümünün *H.pylori* enfeksiyonunda bir belirteç olamayacağı kanaatine varıldı.
4. İstatistiksel analiz sonucunda; kontrol grubuyla *H.pylori* (+) ülser ve *H.pylori* (+) gastrit grupları arasında (sırasıyla, p=0,00041 ve p=0,001), *H.pylori* (+) ülser ile *H.pylori* (-) ülser grupları arasında(p=0,048) ve *H.pylori*(+) gastrit ile *H.pylori*(-) gastrit grupları arasında(p=0,00038) anlamlı derecede fark bulundu.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildikten sonra bu konuda daha aydınlatıcı bilgilere erişmek için aşağıdaki ilave çalışmaların yapılması önerilir:

1. *H.pylori* alfa-hpCA enziminin saflaştırılıp, ELISA pleytlerinin bununla kaplanarak anti CA II ölçümü yapıldıktan sonra CA II kaplanmış olanların ölçümleriyle karşılaştırılabilir. Bu şekilde oluşan antikörün anti alfa-hpCA mı, yoksa anti CA II mi olduğu belirlenebilir.

2. Hasta olarak gastrit ve ülser ayırımı yapmadan, yalnızca *H.pylori* enfeksiyonu olanlardan daha geniş gruplar oluşturarak, daha güvenilir sonuçlara varılabilir.
3. Hasta ve sağlıklı gruplar için seçim yaparken önceden *H.pylori* enfeksiyonu geçirilip geçirilmediği hususu da belirlenmelidir.

7. ÖZET

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya bağlı olarak gelişen otoimmün hastalıklarda vücudun kendi proteinlerine karşı otoantikör oluşturduğu bilinmektedir. *Helicobacter pylori*'den kaynaklanan gastrik enfeksiyon ile otoimmün pankreatit(AIP) arasında bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. AIP'de CA II otoantikörleri artmakta, bundan dolayı, bu hastalığın teşhisinde serum anti CA II ölçümünden yararlanılmaktadır. Ayrıca, *H. pylori* α -hpCA enzimi ile CA II arasında in siliko yöntemle büyük miktarda bir homoloji belirlenmiş ve α -CA antikörlerinin anti CA II'ye benzer otoimmün etkiler sergileyebileceği ifade edilmiştir.

Bu çalışmada, in siliko yöntemle varılan bu sonuçların in vitro olarak doğruluğunu araştırma amacıyla *H.pylori* enfeksiyonuna maruz kalan gastrit ve ülserli hastaların serumlarında CA II otoantikörleri seviyeleri belirlenmiştir. Bunun için 30 kontrol, , 30'ar *H.pylori* pozitif ülser ve gastrit, 30'ar *H.pylori* negatif ülser ve gastrit olmak üzere 150 kişilik çalışma grubu oluşturulmuş ve bunların serumlarında ELISA yöntemiyle CA II otoantikörleri ölçülmüştür. Elde edilen değerlerin istatistiksel analizleri sonucunda *H.pylori* enfeksiyonlu gastritli (p=0,001) ve ülserli (p=0,00041)gruplarla kontrol grubu arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca *H.pylori* (+)ülser ile *H.pylori*(-) ülser (p=0,048) ve *H.pylori*(+) gastrit ile *H.pylori*(-) gastrit (p=0,00038) grupları arasında da anlamlı farklılık belirlenmiştir. ELISA ölçümleri sonucunda *H.pylori* enfeksiyonlu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin bulunma derecesi %8,3 olarak ortaya konulmuş ve bu enfeksiyonların bir belirteci olamayacağı kanaatine varılmıştır. Ancak, *H.pylori* enfeksiyonunda CA II otoantikörlerinde önemli artışlar olduğu da bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: *H. pylori*, anti CA-II, otoimmün hastalık, ELISA

8. SUMMARY

Detection of anti-CA II antibodies in the sera of *Helicobacter pylori* infected patients

Autoimmune diseases are known to arise from the immune responses of the body to its own antigens. A relationship between gastric infection by *Helicobacter pylori* and autoimmune pancreatitis (AIP) has been reported. An increase of carbonic anhydrase II isoenzyme (CA II) autoantibodies in AIP has been shown and its measurement in the sera of AIP affected persons has been suggested for diagnosis. In addition, a remarkable homology between *H. pylori* α -hpCA enzyme and CA II by in silico methods has been reported and it has been speculated that α -CA antibodies might present similar autoimmune effects as CA II autoantibodies.

In this study, in order to confirm the above mentioned in silico results by in vitro methods, the levels of CA II autoantibodies have been determined in the sera of the patients with *H.pylori* infected gastritis and gastric ulcer. For this purpose, 5 research groups each with 30 persons were formed: 1. healthy control group, 2. with *H.pylori* infected gastritis, 3. with gastritis without *H.pylori* infection, 4. with *H.pylori* infected gastric ulcer and 5. with gastric ulcer without *H.pylori* infection. Anti CA II antibody levels in the sera of these persons were measured by ELISA method. After the statistical analysis of the results, significant differences between control group and *H.pylori* infected gastric ulcer ($p=0,00041$) and gastritis groups ($p=0,001$) were detected. By comparison of the *H.pylori* infected and non infected gastric ulcer and gastritis groups remarkable differences were seen ($p=0,048$ and $p=0,00038$, respectively). The degree of positivity of the CA II antibodies in the sera of the *H.pylori* infected patients was found to be 8,3% , so, it was concluded that CA II antibodies could not be a marker of *H.pylori* infection. But, an increase in the levels of CA II antibodies for *H.pylori* infected patients were shown clearly by this investigation.

Key words: *H. pylori*, anti CA-II, autoimmune disease, ELISA

9. KAYNAKLAR

1. Ian, R., Mackay, M.D., Fred, S., Rosen, M.D.: Autoimmun diseases. N Engl J Med., 345(5):899, 2001.
2. Arkwright, D.D., Abirun, M., Cont, A.J. : Autoimmunity in human primary immunodeficiency diseases. Blood., 99:2694-2702, 2002.
3. Yan, J., Mamula, M.J.: B and T cell tolerance and autoimmunity in autoantibody transgenic mice. Int. Immunol., 14: 963-971, 2002.
4. Marrack, P., Kappler, J., Kotzin, B.L. Autoimmun diseases: why and where it occurs. Nat. Med., 7:899-905, 2001.
5. Inagaki, Y., Jinno-Yoshida Y., Ueki H.: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients systemic lupus erythematosus and Sjögren's Syndrome. J. Dermatol Sci., 2:147-54, 1991.
6. Robbins P.F.: The mechanism of autoimmunity remain speculative; despite the elaborate discussion in 'Big Robins' review. Nat. Med., 7:899, 2001.
7. Buckley MJM, O'Morain CA. Helicobacter biology-discovery. In: Farthing MJG and Patchett SE (eds). Helicobacter infection. *Br Med Bull.*, 54:7-16, 1998.
8. Owen RJ. Helicobacter- species classification and identification. In: Farthing MJG and Patchett SE (eds). Helicobacter Infection. *Br Med Bull.*, 54:17-30, 1998.
9. Besisik FS. *Helicobacter pylori* gastritis. Özden A (ed.). Iste *Helicobacter pylori* gastrit, peptik ülser. Turk J Gast. Med., 49-56, 1995.
10. Sandıkçı ÜM. Peptik ülser hastalığında *Helicobacter pylori* nin rolü. Özden A (ed.) Iste *Helicobacter pylori*, gastrit, peptik ülser. Turk J. Gast. Med., 60-70, 1995.
11. Pastorekova, S., Parkla, S., Pastorak, J., Supuran, T. Carbonic Anhydrase: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects. J. Enzyme. Inhib. and Med. Chem., 19(3):199-229, 2004.

12. Hilvo, M., Toluonen, M., Clark, A., Shen, B., Vihinen, M., Parkkila, S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 392: 83-92, 2005.
13. Akisawa, N., Nishimari, I., Miyaji, E., Iwasaki, S., Maedo, T., Shimizu, H., Sato, N., Onishi, S.: The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Jour. Gastroent.*, 34:366-371, 1999.
14. Hosoda, H., Tonoka, A., Uwatoka, S., Hasimoto, N., Ozaki, Y.: Detection of antibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clinica Chimica Acta.*, 34:71-81, 2004.
15. Tripp, B.C., Smith, K., Ferry, J.G.: Minireview: Carbonic Anhydrase: New insights for an ancient enzyme, *J. Biol. Chem.*, 276: 48615-48618, 2001.
16. Inagaki Y, Jinno-Yoshida, Hamasaki Y, Ueki H. A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci.*, 2:147-54, 1991.
17. H. Hosoda, M. Okawa-Takatsuji, A. Tanaka, S. Uwatoko, S. Aotsuka, N. Hasimoto, Y. Ozaki, Y. Ikeda. Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases. *Clinica Chimica Acta*, 42:71-81, 2004.
18. Gordon, S.C., Quattrocio, T.M., Khan, B.A., Kodaali, V.P., Chen, J., Silverman, A.M., et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroent.*, 108:1802-9, 1995.
19. F. Guarneri, C. Guarneri, S. Benvenga. *Helicobacter pylori* and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? *J. Cell. Mol. Med.*, 9: 741-744, 2005.
20. Kountouras, J., Zavas, C., Chatzopoulos, D.: A concept on the role of *Helicobacter pylori* infection, and apoptosis: a proposed relationship, *Pancreas.*, 30: 196-207, 2005.
21. Kountouras, J., Zavas, C., Chatzopoulos, D.: Autoimmune pancreatitis, *Helicobacter pylori* infection in autoimmune pancreatitis. *Pancreas.*, 30: 192-3, 2005.
22. Bhatia, M.: Molecular mimicry in autoimmune pancreatitis an interesting idea. *J. Cell. Med.*, 9:745, 2005.

23. Iyer, R., Barrese, A., Parakh, S., Parker, C., Tripp, B.: Inhibiting profiling of human carbonic anhydrase II by high-throughput screening of structurally diverse, biologically active compounds. *J. Biomol. Screen.*, 11(7):782-791, 2006.
24. Comay, D., Hempfill, D., Wanless, Heatcote E.J., Diamandis E., Doug Hemphill, B.A.: Are antibodies to carbonic anhydrase II specific for anti-mitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis? *Dig. Dis. Sci.*, 45: 2018-2021, 2000.
25. Morcus, E., Moshfegh, A.P., Sachs, G., Seatt, D.R.: The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J. Bacteriol.*, 187:729-738, 2005.
26. Rao, P.P., Sulekha, S., Maithili, D.V., Nallori, P.: Carbonic anhydrase II phenotypes in peptic ulcer and ulcerated cancer. *Int. J. Hum. Genet.*, 6(2): 153-158, 2006.
27. Chirica, I., Elleby, B., Lindskey, S.: Cloning, expression and some properties of alpha-carbonic anhydrase from *helicobacter pylori*. *Med. Chem.*, 1554:1-2, 2001.
28. Kanadalı, A., Özkurt Z.: *Helicobacter pylori* infeksiyonu: Epidemiyoloji, patogenezi ve ilişkili hastalıkları. *Turk. Klim. Derg.*, 17(3): 146-50, 2004.
29. Marshall, B.: *Helicobacter pylori* 20 years on. *Clin. Med.*, 2(2):147-52, 2002.
30. Mentеше, A.: Otoimmün hastalıklarda CA II otoantikörlerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, K.T.Ü. Sağ. Bil. Enst., 2005

ÖZGEÇMİŞ

Sibel YİĞİT, 07.02.1978'de Giresun ili Tirebolu ilçesinde doğdu. İlköğretimi Tirebolu ilçesinde tamamladı. Ortaöğretimini Beşikdüzü Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. Dokuz Eylül Üniversitesi Kimya Öğretmenliği Bölümünü 1996 yılında kazandı. Mezun olduktan sonra Ordu ili Aybastı ilçesinde öğretmenlik yapmaya başladı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaya başladı. Halen Çanakçı Çok Programlı Lisesi Kimya Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.