

**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN MİDE ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE  
HELİCOBACTER PYLORİ'NİN NEDEN OLDUĞU  
DNA ÇİFT SARMAL KIRIKLARI VE OKSİDATİF  
STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Didem ORAL**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2019**



**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN MİDE ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE  
HELİCOBACTER PYLORİ'NİN NEDEN OLDUĞU  
DNA ÇİFT SARMAL KIRIKLARI VE OKSİDATİF  
STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Didem ORAL**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Pınar ERKEKOĞLU**

**ANKARA**

**2019**

## ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MİDE ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE HELİCOBACTER  
PYLORİ'NİN NEDEN OLDUĞU DNA ÇİFT SARMAL KIRIKLARI VE  
OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Uzm.Bio. Didem Oral

Danışman: Doç. Dr. Pınar ERKEKOĞLU

Bu tez çalışması 03.09.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji  
Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Nurşen BAŞARAN  
Hacettepe Üniversitesi



Tez Danışmanı: Doç.Dr. Pınar Erkekoğlu  
Hacettepe Üniversitesi



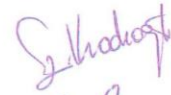
Üye: Prof.Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof.Dr. Belma GÜMÜŞEL  
Lokman Hekim Üniversitesi



Üye: Doç.Dr. Ela Kadioğlu  
Gazi Üniversitesi



Üye: Doç.Dr. Suna Sabuncuoğlu  
Hacettepe Üniversitesi



Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

24 Eylül 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- o Tezime ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

24/09/2019



Didem ORAL

I “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç.Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığımı beyan ederim.



**Didem ORAL**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bilgisi, ileri görüşlülüğü ile ufkumu açan, desteği ile her zaman yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Ülfet Pınar Erkekoğlu'na,

Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimleri ile beni destekleyen Sayın Prof.Dr. Belma Gümüşel'e,

Bilgi ve deneyimleriyle ve destekleri ile doktora eğitimim boyunca ufkumu açan ve Farmasötik Toksikoloji'yi çok sevmemi sağlayan tüm bölüm hocalarıma,

Destekleri ve anlayışları ile her zaman yanımda olan dekanımız Sayın Prof.Dr. Terken Baydar ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Ülkü Ündeğer Bucurgat'a,

Tez çalışmalarımda desteği ve dostluğu ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Uzm. Ecz. Ünzile Sur'a,

Tez çalışmalarım sürecinde desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr.Yakut Akyön'e, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Dilara Zeybek'e,

Doktora çalışmalarına başlamamdaki destekleri için sayın hocam Prof.Dr. Ahmet Başaran'a,

Fedakârlıkları ve sevgileri ile bana olan inaçlarını hiç kaybetmeden her zaman destek olan, güç veren doktoramı ithaf ettiğim çok sevgili anne ve babama,

Sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

**Didem, O. İnsan Mide Adenokarsinoma Hücrelerinde Helicobacter Pylori'nin Neden Olduğu DNA Çift Sarmal Kırıkları Ve Oksidatif Stresin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara,2019.** Çeşitli mikroorganizmaların oluşturduğu infeksiyonların reaktif oksijen bileşikleri (ROS) ve reaktif azot bileşiklerinin (RNS) oluşumuna yol açtığı iyi bilinmektedir. Bu bileşiklerin de intrasellüler oksidan/antioksidan dengeyi değiştirip oksidatif strese neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Oksidatif stres, birçok farklı mekanizma ile DNA hasarı oluşturabilmektedir. DNA hasarı, basit ve onarılabılır baz lezyonlarından, en tehlikeli DNA hasarı olan DNA çift sarmal kırıklarına (DSB) dek oldukça geniş bir yelpazede görülebilir. Radyasyon ve bazı bakteri toksinleri DSB'yi indükleyerek, karsinojeneze yol açabilir. *Helicobacter pylori* gastrik mukozada kronik infeksiyona neden olan bir Gram negatif bakteridir. *Helicobacter pylori* infeksiyonu Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından “Grup I karsinojen” olarak sınıflandırılmıştır. *Helicobacter pylori* 'nin neden olduğu toksisite altında yatan mekanizmalar ve bu bakterinin yol açtığı gastrik karsinojenizin mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Çalışmalar *Helicobacter pylori* 'nin hem doğrudan DNA hasarı yaparak, hem de epigenetik mekanizmalarla genetik instabiliteye neden olduğunu göstermektedir. *Helicobacter pylori* infeksiyonu konak DNA'sında oksidatif hasara neden olmaktadır. Literatürde, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun oksidatif strese ve DSB'ye neden olduğu ve DSB onarım mekanizmalarını da etkileyebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak, *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi inceleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu verilerin ışığında gerçekleştirilen tez kapsamında, gastrik adenokarsinoma (AGS) hücrelerinin *Helicobacter pylori*'ye maruziyeti sonucu ortaya çıkabilecek olası sitotoksisite, intrasellüler ROS artışı ve oksidatif stres, DNA baz lezyonları, DNA onarım proteinlerindeki değişiklikler, apoptotik ve otofajik değişiklikler detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca, AGS hücrelerinin *Helicobacter pylori*'yle infekte olması sonucu, hücrelerde DSB'nin bir biyogöstergesi olan histon 2A ailesi üyesi X (H2AX) fosforilasyonunun ( $\gamma$ -H2AX) belirlenmiştir. Diğer taraftan, DSB onarım yollarıyla ile *Helicobacter pylori* maruziyeti sonucu ortaya çıkabilecek DSB'lerin onarılabileceği de düşünülerek çalışmaya bir DSB onarımında önemli rolü olan DNA-protein kinaz (DNA-PK) inhibitörü eklenmiş ve ilgili parametreler DNA-protein kinaz inhibitörü varlığında da ölçülmüştür. Bu şekilde, DSB onarımı bozulmuş bireylerde *Helicobacter pylori* infeksiyonunun neden olabileceği olası durumun öngörülmesi planlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun özellikle DNA-PK inhibitörü varlığında oksidatif streste önemli artışlara, DNA onarım proteinlerinde değişikliklere ve  $\gamma$ -H2AX düzeylerinde belirgin artışlara yol açtığı ve apoptozu ve otofajiyi tetiklediği görülmüştür. Diğer taraftan, *Helicobacter pylori* ve DNA-PK inhibitörü birlikte maruz kalan grupta apoptoz ve otofajinin çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun özellikle DSB onarımında sorun olan hücrelerde ciddi sorunlara yol açabileceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Helicobacter pylori*, oksidatif stres, Nu7441, AGS hücreleri, gastrik adenokarsinoma, DNA çift sarmal kırığı, otofaji, apoptoz.



## ABSTRACT

**Didem, O. Evaluation of DNA Double Strant Breaks and Oxidative Stress caused by *Helicobacter pylori* in Human Adenogastric Carcinoma Cells. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Toxicology Program, Doctorate Thesis, Ankara, 2019.** It is well-known that infections caused by various microorganisms lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Several studies have shown that these species can change the intracellular oxidant/antioxidant balance and cause oxidative stress. Oxidative stress can cause DNA damage by many different mechanisms. DNA damage can be observed in a wide range, from simple and repairable base lesions to DNA double-strand breaks (DSBs), which are the most dangerous DNA damage types. Radiation and some bacterial toxins can cause carcinogenesis by inducing DSBs. *Helicobacter pylori* is a gram negative bacterium that causes chronic infection in gastric mucosa. Approximately 50% of the world's population has been reported to be infected with chronic *Helicobacter pylori* infection which causes gastritis, peptic ulcer, stomach adenocarcinoma and gastric mucosal lymphoma. *Helicobacter pylori* infection is categorized as "Group I carcinogen" by the International Agency for Research on Cancer. The mechanisms underlying the toxicity of *Helicobacter pylori* infection and the mechanism of gastric carcinogenesis caused by this certain bacterium are not fully understood yet. Studies show that *Helicobacter pylori* infection can cause genetic instability both by direct DNA damage and by epigenetic mechanisms. *Helicobacter pylori* infection causes oxidative damage nuclear and mitochondrial DNA of the host. In addition, it can lead to chromosomal instability, microsatellite instability and mutations by affecting DNA methylation. There are studies in literature that show *Helicobacter pylori* infection can cause DSBs, oxidative stress and may also affect DSB repair mechanisms. However, there are not many studies that investigate the association between *Helicobacter pylori* infection and oxidative stress. Studies to date have generally been conducted on clinical specimens, and focused on the direct treatment of infection rather than focusing on the toxicity mechanisms of the bacterium. In the light of these data, the possible cytotoxicity, intracellular ROS elevations, and oxidative stress, DNA base lesions, changes in DNA repair proteins, apoptotic and autophagic changes caused by *Helicobacter pylori* in gastric adenocarcinoma (AGS) cell line were investigated in detail in this thesis. In addition, AGS cells which were infected with *Helicobacter pylori* were investigated for the presence of histone 2A family X (H2AX) phosphorylation ( $\gamma$ -H2AX), a biomarker of DSBs. On the other hand, by evaluating that DSBs caused by *Helicobacter pylori* can be repaired, a DNA-protein kinase (DNA-PK, an important DSB repair protein) inhibitor was also included to the study and the related parameters were measured. Thus, we planned to foresee the outcomes of *Helicobacter pylori* infection in people which disrupted DSB repairs. According to the results, *Helicobacter pylori* infection caused significant increases in oxidative stress, changes in DNA repair proteins and increases in  $\gamma$ -H2AX levels, particularly in the presence of DNA-protein kinase inhibitor. Moreover, *Helicobacter pylori* infection triggered apoptosis and autophagy and cell death was significantly higher in both DNA-protein kinase inhibitor and *Helicobacter pylori* -exposed group.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*, oxidative stress, Nu7441, AGS cells, gastric adenocarcinoma, DNA double strand breaks, autophagy, apoptosis.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xxi
TABLolar	xxiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.2. <i>Helicobacter pylori</i> İnfeksiyonunun Patogenezisi	15
2.2.1. Midedeki asidik ortama adaptasyon	17
2.2.2. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Virülans Faktörleri	22
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> -Konakçı Etkileşimi	43
2.3.1. Gastrik Mukozal İmmünite	43
2.3.2. <i>Helicobacter pylori</i> ve reaktif oksijen bileşikleri	49
2.3.3. <i>Helicobacter pylori</i> -DNA Hasarları	51
2.4. İnlamasyon-Kanser İlişkisi	59
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	65
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	66
3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre ve Bakteri Hattı	66
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	67
3.4.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	67
3.4.2. Nu7441'in hazırlanması	67
3.4.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	67
3.4.4. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler	68

3.4.5. AGS Hücrelerinin Lizisinde Kullanılan Çözeltiler	68
3.4.6. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	69
3.4.7. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	69
3.4.8. Glutasyon Peroksidaz 1 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	70
3.4.9. Katalaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	71
3.4.10. Süperoksit Dismutaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	72
3.4.11. Total Glutasyon (GSH) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	73
3.4.12. Total Antioksidan Kapasite (TAOC) belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	74
3.4.13. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	75
3.4.14. Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	76
3.4.15. 8-OHdG (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) ölçümünde kullanılan Çözeltiler	77
3.4.16. OGG1 Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	78
3.4.17. H2AX Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	79
3.4.18. Kaspaz 3 Tayininde Kullanılan Çözeltiler	80
3.4.19. Kaspaz 8 Tayininde Kullanılan Çözeltiler	81
3.4.20. BECN1(Beclin-1) Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	82
3.4.21. LC3 (MAP1 LC3 B) Protein Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	83
3.4.22. P62 Protein Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	84
3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	85
3.5.1. Hücre Kültürü	85
3.5.2. Bakteri Kültürü	86
3.5.3. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi	87
3.5.4. AGS Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	88
3.5.5. Mikroskopik İncelemeler	90
3.5.6. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi	91
3.5.7. Protein Miktarının Belirlenmesi	92
3.5.8. AGS Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması	93

3.5.9. Glutatyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü	94
3.5.10. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	95
3.5.11. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	97
3.5.12. Total Glutatyon Düzeylerinin Belirlenmesi	99
3.5.13. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü	100
3.5.14. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	102
3.5.15. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü	103
3.5.16. 8-hidroksi-2'deoksiguanin (8-OHdG) Düzeylerinin Belirlenmesi	105
3.5.17. OGG1 (8-Oxoguanin Glikozilaz 1) Düzeylerinin Ölçülmesi	107
3.5.18. H2AX ve Pan H2AX Düzeylerinin Ölçülmesi	108
3.5.19. Kaspaz 3 Düzeylerinin Ölçümü	111
3.5.20. Kaspaz 8 Düzeylerinin Ölçümü	112
3.5.21. Beclin-1 (BECN1) Düzeylerinin Ölçümü	114
3.5.22. LC3 Düzeylerinin Ölçümü	116
3.5.23. p62 Düzeylerinin Ölçümü	118
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	120
<b>4. BULGULAR</b>	121
4.1. Sitotoksisite Tayini	121
4.2. Mikroskopik İncelemeler	122
4.2.1. Işık mikroskopu İncelemeleri	122
4.2.2. Elektron mikroskopu İncelemeleri	125
4.3. Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Üretiminin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	137
4.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.	139
4.4.1. Glutatyon Peroksidaz 1 Aktivitesi	139
4.4.2. Katalaz Aktivitesi	140
4.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi	141
4.6. Total Glutatyon Düzeyleri	142
4.7. Total Antioksidan Kapasite (TAOC) Düzeyleri	142
4.8. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri (TBARS) Düzeyleri	143
4.9. Protein Karbonil Düzeyleri	144
4.10. DNA Baz Hasarı Analizleri	145

4.11. DNA Onarım Proteini ( OGG1) Düzeyleri	146
4.12. DNA Çift Kırıkları Düzeyleri	147
4.12.1. H2AX Düzeyleri	147
4.12.2. Pan $\gamma$ - H2AX Düzeyleri	148
4.13. Apoptotik Analizler	149
4.13.1. Kaspaz 3 Düzeyleri	149
4.13.2. Kaspaz 8 Düzeyleri	150
4.14. Otofaji Analizleri	151
4.14.1. Beclin-1 Düzeyleri Analizleri	151
4.14.2. LC3 Düzeyleri Analizleri	152
4.14.3. p62 Düzeyleri Analizleri	153
<b>5. TARTIŞMA</b>	155
5.1. Sitopatolojik Değerlendirmeler	157
5.2. Hücre Canlılığı ve ROS	158
5.3. Oksidan/Antioksidan Parametreler Üzerine Etkiler	162
5.4. Hücre Ölümü Mekanizmaları	169
5.5. DNA Hasarı	175
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	179
<b>7. KAYNAKLAR</b>	183
<b>8. EKLER</b>	
Ek 1. Orjinallik Ekran Çıktısı	
Ek 2. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>8-OHdG</b>	8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
<b><math>\gamma</math>-GGT</b>	Gama glutamil transpeptidaz
<b><math>^1O^2</math></b>	Singlet Oksijen
<b>8-oksodG</b>	8-Okzo-7-Hidro-2'-Deoksiguanozin
<b>AGS</b>	Gastrik Adenokarsinoma Hücreleri
<b>AhpC</b>	Alkilhidroperoksiredüktaz
<b>Ahp-C</b>	Alkil hidroksiperoksidaz redüktaz
<b>AJs</b>	Adhezyon bağlantıları
<b>AlpA/B</b>	Adherens Assosiyasyon Protein A Ve B
<b>AP</b>	Abazik Alan
<b>APE1</b>	AP endonükleaz 1
<b>ATM</b>	Ataksi Telenjiektazi Mutant
<b>ATP</b>	Adenozintrifosfat
<b>ATPaz</b>	Adenozin trifosfataz
<b>ATR</b>	Serin/Treonin-Protein Kinaz
<b>BabA</b>	Kan grubu antijeni bağlayıcı adhezin toksini
<b>BCA</b>	Bişinkoninik Asit
<b>Bcl-2</b>	B-hücre lenfoması proteinleri
<b>BECN1</b>	Beclin1 proteini kodlayan gen
<b>BER</b>	Baz Eksizyon Onarımı
<b>Cag A</b>	Sitotoksin-assosiyasyon gen A
<b>CagPAI</b>	Sitotoksin Assosiyasyon Gen Patogenisite Adacığı
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozinmonofosfat

<b>CAT</b>	Katalaz
<b>COX-2</b>	Siklooksijenaz 2
<b>Csk</b>	C-Terminal Src kinaz
<b>CuZnSOD</b>	Bakır-Çinko Süperoksit Dismutaz
<b>CXCL8</b>	İnterlökin 8 Prekürsörü
<b>CYP450</b>	Mikrozomal sitokrom P450
<b>CYP450</b>	Mikrozomal Sitokrom P450
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>D-PBS</b>	Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
<b>Drp1</b>	Dynamin Bağlantılı Protein
<b>DSBR</b>	Çift Zincir Kırıkları Onarımı
<b>DupA</b>	Duodenal Ülser Başlatıcı Gen A
<b>EC-SOD</b>	Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz
<b>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu
<b>EGFR</b>	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>ELISA</b>	Enzim-Bağlı İmmünosorban Yöntemi
<b>EMT</b>	Epitelyal-Mezenşimal Dönüşüm
<b>EPIYA</b>	Glu-Pro-Ile-Try-Ala
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>ERK</b>	Sinyal Regüle Kinaz
<b>FAK</b>	Fokal Adezyon Kinaz
<b>FBS</b>	Fötal Bovin Serum

<b>FDA</b>	Floresan-diasetat
<b>GPI</b>	Glikozilfosfotidilinositol
<b>GPI-R</b>	Glikozilfosfotidilinositol Protein-Lipit Reseptörü
<b>GPX</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon Redüktaz
<b>GRO-<math>\alpha</math></b>	Büyüme Regüle Protein
<b>GSH</b>	İndirgenmiş Glutasyon
<b>GSSG</b>	Okside Glutasyon (Glutasyon Disülfit)
<b>GST</b>	Glutasyon S-Transferaz
<b>GTPaz</b>	Guanozin Trifosfataz
<b>H2AX</b>	Histon 2A Ailesi Üyesi X
<b>H2O2</b>	Hidrojen Peroksit
<b>HAMP</b>	Hepsidin Proteini
<b>HAT</b>	Histonasetil Transferaz
<b>HBV</b>	Hepatit B Virüsü
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>HCO<sub>3</sub></b>	Bikarbonat
<b>HCO<sub>3</sub>-</b>	Bikarbonat
<b>HCV</b>	Hepatit C Virüsü
<b>HDAC</b>	Histondeasetilaz Enzim
<b>HO·</b>	Hidroksil Radikali
<b>HOCl</b>	Hipoklorür
<b>HopZ</b>	Dış membran proteini Z
<b>Hp-NAB</b>	Helicobacter Pylori-Nötrofil Aktive Edici Protein



<b>HPV</b>	İnsan Papilloma Virüsü
<b>HR</b>	Homolog rekombinasyon
<b>IARC</b>	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>IC30</b>	Hücrelerin %30'unun Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
<b>IC50</b>	Hücrelerin %50'sinin Öldüğü İnhibitor Konsantrasyon
<b>ICAM-1</b>	Hücre İçi Adhezyon Molekülü-1
<b>IgG</b>	İmmüoglobülin G
<b>IL-1</b>	İnterlökin 1
<b>IL-17</b>	İnterlökin 17
<b>IL-1R</b>	İnterlökin 1 Reseptör-Antagonist
<b>IL-6</b>	İnterlökin 6
<b>IL-8</b>	İnterlökin 8
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	İnterferon- $\gamma$
<b>KOH</b>	Potasyum Hidroksit
<b>Kromojen</b>	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
<b>LC3</b>	Mikrotübül-assosiye protein 1A/1B hafif zincir 3BLC3 proteini
<b>Lef</b>	Lenfoid Arttırıcı Faktör
<b>LOOH</b>	Lipit peroksit
<b>LP</b>	Lipit Peroksidasyonu
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>LPS</b>	Lipopolisakkaritler
<b>LRP1</b>	Reseptör-Bağlantılı Protein-1
<b>LTB4</b>	Lökotrien B4
<b>MALT</b>	Mukoza İlişkili Lenfoid Doku

<b>MALT Lenfoma</b>	Mukoza Assosiyel Lenfoid Doku Lenfoma
<b>MAP1LC3B</b>	Mikrotübül-assosiyel protein 1A/1B hafif zincir 3BLC3 geni
<b>MAP3K7</b>	Mitojen-Aktive Protein Kinaz 7
<b>MAPK</b>	Mitojen Aktive Protein Kinaz
<b>MCP</b>	Monosit Kemoatraktan Protein
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MHC</b>	Majör Histokompatibilite Kompleks
<b>MKN74</b>	İnsan Gastrik Tubuler Adenokarsinoma Hücreleri
<b>MMP-1</b>	Matriks Metalloproteinaz 1
<b>MMR</b>	Yanlış Eşleşmiş Protein Onarımı
<b>MnSOD</b>	Mangan Süperoksit Dismutaz
<b>MNU</b>	N-metil-N-nitrozamin
<b>MOİ</b>	Multiplicity of Infection (Hücre başına eklenen bakteri sayısı)
<b>MPO</b>	Myeloperoksidaz
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-İl)-2,5 Difenil Tetrazolyum Bromür
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NADH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>NADPH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>NAP</b>	Nötrofil aktive edici protein
<b>NAP</b>	Nötrofil Aktive Edici Protein
<b>NER</b>	Nükleotit Eksizyon Onarımı

<b>NFAT</b>	T-hücre Nükleer Faktörü
<b>NF-κB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>NHEJ</b>	Non-homolog bağlanma ucu
<b>NIX</b>	Parkin ve Nip-3 benzeri protein
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NO.</b>	Nitrik Oksit
<b>NO<sub>2</sub>Cl</b>	Nitril Klorid
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrat
<b>NOS</b>	Nitrikoksit Sentetaz
<b>NOX</b>	NADPH oksidaz
<b>Nu7441</b>	8-(4-dibenzotienil)-2-(4-morfolinil)-4H-1-benzopiran-4
<b>O<sub>2</sub>.-</b>	Süperoksit Anyonu
<b>OH.</b>	Hidroksil Radikali
<b>OipA</b>	Dış İnflamatuvar Protein A
<b>OMP</b>	Dış Membran Proteini
<b>ONOO</b>	Peroksinitrit
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
<b>PCNA</b>	Proliferatif Hücre Nükleer Antijen
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>pH</b>	Hidrojenin Gücü
<b>PINK1</b>	Fosfataz Tensin (PTEN) İle İndüklenen Kinaz 1
<b>PTEN</b>	Fosfataz Tensin
<b>Purpald(Kromojen)</b>	Amino-3-Hidrazino-5-Merkapto-1,2,4-Triazol
<b>Rab7</b>	Ras-İlişkili Protein 7

<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RNS</b>	Reaktif Azot Türleri
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RPTP</b>	Protein Tirozin Fosfataz
<b>RPTP</b>	Reseptör Protein Tirozin Fosfataz
<b>RT-PCR</b>	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RUNX3</b>	Run ilişkili transkripsiyon faktörü 3
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
<b>SHP-2</b>	Tirozin Spesifik Protein Fosfataz Non-Reseptör Tip 2
<b>sLea</b>	Lewis a
<b>sLex</b>	Siyalik Lewis X
<b>SMOX</b>	Spermin Oksidaz
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>STAT3</b>	Transkripsiyon Faktörü 3 Aktive Edici Protein
<b>TAOC</b>	Total antioksidan kapasite
<b>TBA</b>	Tiyobarbitürik Asit
<b>TBARS</b>	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikler
<b>TCA</b>	Trikloroasetik Asit
<b>Tcf</b>	T-hücreci Aktivatörü
<b>Tlp</b>	Transducer Like Protein
<b>TLR-4</b>	Toll Benzeri Reseptör 4
<b>TNFR</b>	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
<b>TP53BP2</b>	Tümör Supresör Protein p53-2

<b>TrxR</b>	Tiyoredoksin Redüktaz
<b>TUNEL</b>	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Dntp Nick Ucu Etiketleme
<b>UreA</b>	Üreaz Subünite A
<b>UV</b>	Ultraviyole Işın
<b>VacA</b>	Vakuole edici sitotoksin A
<b>V-ATPaz</b>	Vakuoler Tip ATP-az
<b>ZO-1</b>	Sıkı Bağlantı Proteini 1

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Helicobacterinin genel yapısı	4
2.2. Helicobacter pylori'nin neden olduğu hastalıklar	7
2.3. Helicobacter pylori ve gastrik karsinogenez gelişimi	8
2.4. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin virülans faktörleri	21
2.5. VacA'nın moleküler yapısı	23
2.6. CagA'nın moleküler yapısı	34
2.7. Helicobacter pylori'nin konakçı genomundaki genetik ve epigenetik mekanizmaları.	55
2.8. Kronik inflamasyonun neden olduğu karsinogenez gelişimi	62
3.1. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması	89
3.2. Protein standart eğrisi.	93
3.3. Katalaz aktivitesi standart eğrisi.	96
3.4. Süperoksit dismutaz ölçümü reaksiyon şeması.	97
3.5. Süperoksit dismutaz standart eğrisi.	98
3.6. GSH döngüsü.	99
3.7. GSH standart eğrisi.	100
3.8. Total antioksidan kapasite standart eğrisi	101
3.9. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.	102
3.10. MDA standart eğrisi.	103
3.11. 8-OHdG standart eğrisi.	106
3.12. OGG1 standart eğrisi.	108
3.13. H2AX standart grafiği.	110
3.14. Pan H2AX standart grafiği	110
3.15. Kaspaz 3 standart eğrisi.	112
3.16. Kaspaz 8 standart eğrisi.	114
3.17. BECN1 standart eğrisi.	116
3.18. LC3 standart eğrisi	118
3.19. P62 standart eğrisi	120
4.1. a. AGS hücre canlılığı üzerinde HP'nin (MOİ değerlerinin) etkisi	121
4.2. b AGS hücre canlılığı üzerinde Nu741+HP'nin (MOİ değerlerinin) etkisi	122
4.3. Kontrol grubu mikrografi	123

4.4.	HP grubu mikrografi	123
4.5.	Nu7441 grubu mikrografi	124
4.6.	HP + Nu7441 mikrografi	124
4.7.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	125
4.8.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	126
4.9.	Kontrol grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	127
4.10.	<i>Helicobacter pylori</i> grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	128
4.11.	<i>Helicobacter pylori</i> grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	129
4.12.	<i>Helicobacter pylori</i> grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	130
4.13.	<i>Helicobacter pylori</i> grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	131
4.14.	Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	132
4.15.	Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	133
4.16.	HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	134
4.17.	HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	135
4.18.	HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	136
4.19.	HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri	137
4.20.	Hücre içi ROS düzeyleri (Kontrole göre % olarak verilmiştir)	138
4.21.	Glutasyon peroksidaz 1 aktivitesi	139
4.22.	Katalaz aktivitesi	140
4.23.	Süperoksit dismutaz aktivitesi.	141
4.24.	Total GSH düzeyleri.	142
4.25.	TAOC düzeyleri	143
4.26.	TBARS düzeyleri	144
4.27.	Protein karbonil düzeyleri	145
4.28.	8-OHdG düzeyleri	146
4.29.	OGG1 düzeyleri	147
4.30.	$\gamma$ -H2AX düzeyleri	148
4.31.	Pan $\gamma$ - H2AX düzeyleri	149
4.32.	Kaspaz 3 düzeyleri	150
4.33.	Kaspaz 8 düzeyleri	151
4.34.	Beclin-1 düzeyleri	152
4.35.	LC3 düzeyleri	153
4.36.	P62 düzeyleri	154

## TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. AGS hücre hattı ile ko-kültürü yapılacak olan bakterilerin IC <sub>30</sub> değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 24 saatlik inkübasyon da kullanılan infeksiyon çokluğu (Multiplicity of Infection, MOI, bir canlı memeli hücresi başına kaç adet bakteri hücresinin tekabül edeceği) değerleri	86
3.2. MTT deneyi ile tayin edilen <i>Helicobacter pylori</i> /Nu7441/AGS ve <i>Helicobacter pylori</i> /AGS grubuna ait IC <sub>30</sub> dozları.	87
4.1. Çalışma gruplarının IC <sub>30</sub> ve IC <sub>50</sub> değerleri	121
4.2. Hücre içi reaktif oksijen bileşiklerinin kontrole göre (%) artış oranları	138
4.3. Glutatyon peroksidaz 1 aktivitesi	139
4.4. Katalaz aktivitesi	140
4.5. Süperoksit dismutaz aktivitesi	141
4.6. Total GSH düzeyleri	142
4.7. TAOC düzeyleri	143
4.8. TBARS düzeyleri	144
4.9. Protein karbonil düzeyleri	145
4.10. 8-OHdG düzeyleri	146
4.11. OGG1 düzeyleri	147
4.12. $\gamma$ -H2AX düzeyleri	148
4.13. Pan $\gamma$ -H2AX düzeyleri	149
4.14. Kaspaz 3 düzeyleri	150
4.15. Kaspaz 8 düzeyleri	151
4.16. Beclin-1 düzeyleri	152
4.17. LC3 düzeyleri	153
4.18. p62 düzeyleri	154



## 1. GİRİŞ

İnflamasyon immün sistemin fiziksel (X-ışınları,  $\gamma$ -radyasyon, UVA/B ışınları), kimyasal (çeşitli ilaçlar ya da asbest gibi çevre kirleticileri) ve biyolojik (bakteriler, virüsler ya da parazitler) ajanlara karşı doğal savunma mekanizmasıdır (1). İnflamasyon, aynı zamanda kronik infeksiyon ve inflamatuvar hastalıklar tarafından da indüklenebilir. Kanser vakalarının yaklaşık olarak %25'nin kronik inflamasyon kaynaklı olduğu bilinmektedir (2). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) dünya genelindeki kanser vakalarının yaklaşık %18'nin bakteri, virüs ve parazit nedenli enfeksiyöz hastalıklardan kaynaklandığını bildirmiştir (3). Virüsler, bakteriler ve parazitlerin neden olduğu kronik inflamasyonun yılda 1,6 milyon inflamasyon kaynaklı kanser vakasına yol açtığı belirtilmiştir (4). Yapılan çalışmalarda birçok bakteri türünün ürettiği toksinlerin kronik infeksiyona ek olarak hücre siklusunda bozulmaya ve hücre büyümesinde değişimlere neden olduğu gösterilmiştir (5). Patojen ajanların konakçı hücre genomunu salgıladıkları genotoksinler ve onkoproteinler aracılığı ile etkileyebildikleri, bu proteinlerin hücresel DNA da mutasyonları indüklediği ve DNA onarım mekanizmasında değişimlere yol açabildiği bilinmektedir (6). Son yıllarda kronik bakteriyel infeksiyonların kanser gelişimi üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmış ve birçok bakteri infeksiyonunun onkogenез üzerindeki etkisi gösterilmiştir (7). Yapılan çalışmalarda, birçok bakteri türünün kronik infeksiyon ya da ürettikleri toksinler yoluyla hücre siklusunun değişmesine yol açtıkları ve karsinogenik kimyasal maddelere benzer şekilde normal hücre büyümesi ve apoptotik değişimlere neden olan DNA hasarları oluşturabildikleri belirtilmiştir. Örneğin, *Salmonella typhimurium*'nin mesane kanserine, *Streptococcus bovis*'in kolon kanserine ve *Chlamydia bovis*'in akciğer kanserine neden olduğuna dair bulgular mevcuttur. Dünya genelinde en yaygın infeksiyon hastalıklarından biri olan ve dünya popülasyonunun yaklaşık %40-%50'sinin infekte olduğu *Helicobacter pylori*'nin ise gastrik kanser ve mukoza assosiyе lenfoid doku (MALT) tipi lenfomaya neden olduğuna dair kesin bulgular vardır ve *Helicobacter pylori* infeksiyonu IARC tarafından "Grup 1 karsinogen (insanda kesin karsinogen)" olarak sınıflandırılmaktadır (5,8).

Gastrik kanserler dünya genelinde kansere bağlı ölümlerinde ikinci sırada yer almakta olup, her yıl yaklaşık 1 milyon yeni tanı ile ve yılda yaklaşık 750.000 ölümlü

vaka ile dikkati çekmektedir. Gastrik kanserler, çok faktörlü hastalıklar olup, risk faktörleri arasında çevresel faktörler, genetik faktörler, patojen (*Helicobacter pylori*)-konakçı ilişkisi ve ayrıca tüm bu parametrelerin bir arada olduğu çoklu faktörler yer almaktadır. Gastrik kanserler Doğu Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde dünya genelindeki vakaların 2/3'nü kapsamaktadır ve bu vakaların %42'lik bir oranı Çin'de görülmektedir (9,10).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, *Helicobacter pylori* kronik infeksiyonunun oksidatif DNA hasarı ve bunun sonucunda gastrik kanser gelişimine neden olan reaktif oksijen bileşikleri (ROS)/reaktif azot bileşikleri (RNS) oluşumunda yol açtığını bildirilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin oluşturduğu gastrik inflamasyonun şiddeti, konakçının genetik özellikleri, konakçının immün yanıtı ve diyet gibi çevresel faktörlere ve bakteriye özgü faktörlerin bir bütün olarak etki etmesine bağlıdır (11).

Dünya popülasyonunun yaklaşık %50'sinin gastrit, peptik ülser, mide adenokarsinoma ve mide mukozal lenfomasına neden olan kronik *Helicobacter pylori* ile infekte olduğu rapor edilmektedir. *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu toksisite altında yatan mekanizmalar ve neden olduğu gastrik karsinogenезin mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Çalışmalar, *Helicobacter pylori*'nin hem doğrudan DNA hasarı yaparak, hem de epigenetik mekanizmalarla genetik instabiliteye neden olduğunu göstermiştir (12,13). *Helicobacter pylori* infeksiyonu konağın çekirdek ve mitokondri DNA'sında oksidatif hasara neden olur. Ayrıca DNA metilasyonunu etkileyebilir; kromozomal instabilite, mikrostallit instabilite ve mutasyonlar gibi doğrudan değişimlere neden olabilir (14). Ayrıca, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA çift sarmal kırıklarına (DSB) ve glutatyon (GSH) tüketimine neden olduğu ve DSB onarım mekanizmalarını da etkileyebileceği belirtilmiştir (12,15). Tüm bu olayların ise glandular atrofi, kronik inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, glandular epitel hücrelerde metaplazi ve sonunda da gastrik kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (10).

Dünya genelinde ve ülkemizde *Helicobacter pylori* infeksiyonu ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Ancak, *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi ve bakterinin yol açtığı düşünülen DSB kırıklarının oluşumu ile ilgili mekanizmaları inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bugüne kadar

yapılan çalışmalar genelde klinik örneklerden yapılmış olup, bakterinin toksisite mekanizmalarına odaklanmaktan ziyade doğrudan infeksiyonun tedavisine yöneliktir (12,13).

Bu tez kapsamında insan gastrik adenokarsinoma hücreleri (AGS)'nin *Helicobacter pylori*'ye maruziyeti sonucu ortaya çıkabilecek;

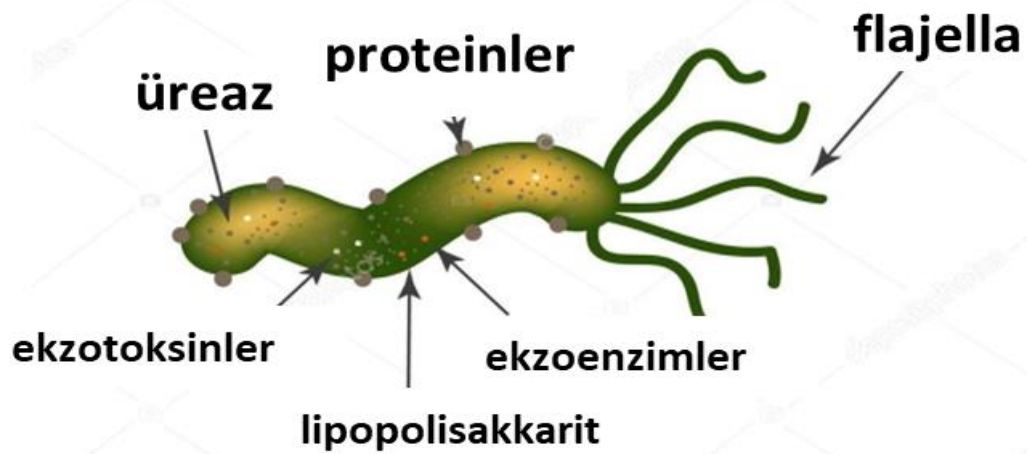
- Sitotoksik etkiler,
- Maruziyet sonucu oluşabilecek istenmeyen etkilerin altında yatan başlıca mekanizmalardan olan; oksidatif stres ve oksidan/antioksidan statü değişiklikleri [ROS üretimi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz aktivitesi (CAT), glutatyon peroksidaz 1 aktivitesi (GPx1), total glutatyon düzeyleri, total antioksidan kapasite, lipid peroksidasyon, protein oksidasyonu],
- DNA onarım proteinlerindeki değişiklikler (8-okzoguanin DNA glikosilaz, OGG1) ve DSB [histon 2A ailesi üyesi X (H2AX) fosforilasyonunun belirlenmesi ( $\gamma$ -H2AX) ile],
- Sitopatolojik, apoptotik ve otofajik değişiklikler değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasına, ayrıca bir *Helicobacter pylori* AGS hücrelerine bir DSB onarım inhibitörü [8-(4-dibenzotienil)-2-(4-morfolinil)-4H-1-benzopiran-4-on, Nu7441] ile birlikte de uygulanmış ve ilgili parametreler Nu7441 varlığında da ölçülmüştür. Bu şekilde DSB onarımı bozuk veya bir şekilde bozulmuş bireylerde (immün sistem bozuklukları, kanser, diyabet vb. durumlarda) *Helicobacter pylori*'nin neden olabileceği tüm toksik etkilerin yalnızca *Helicobacter pylori* uygulanan grupla da karşılaştırılması yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Helicobacter Pylori*

*Helicobacter pylori*; yaklaşık 3 µm uzunluğunda ve 5 µm çapında gram negatif, katalaz, oksidaz ve üreaz pozitif, mikroaerofilik ve nötrofilik heliks biçimli bir bakteridir (16,17). 3 ila 6 adet yaklaşık 3 µm uzunluğunda ünipolar flagellar *Helicobacter pylori*'nin, gastrik mukoza içinde hareket etmesini ve kolonize olmasını sağlar (Şekil 2.1.) (18).



Şekil 2.1. *Helicobacter*in genel yapısı (18)

Yapılan çalışmalar mikroaerofilik olan *Helicobacter pylori*'nin optimal yaşama koşullarının yüksek nemli ortamda, pH 5.5-8 değerinde, %2-%5 O<sub>2</sub> ve %5-10 CO<sub>2</sub> seviyelerinde olduğunu göstermiştir (19). Düşük partial oksijen basınçlı, yüksek konsantrasyonlarda gastrik ve sindirim enzimleri içeren gastrik mukozada kolonize olan *Helicobacter pylori*, gastrik ortamdaki pH'ı salgıladığı üreaz enzimi ile yükselterek ve flagellası ile mide duvarı mukozasının iç tabakalarına hareket ederek gastrik ortama adapte olabilmektedir (20). *Helicobacter pylori*'nin salgıladığı üreaz enzimi pH'ı 1-2 civarında olan gastrik ortamda tampon görevi görürken, helikal şekli ve ünipolar flagellası gastrik epitelyumu kaplayan mukoza tabakasının içinde hareket edebilmesine olanak tanır. Mide epitelyal yüzeyine tutunmasının yanı sıra, proksimal duodenum ve nadiren özafagusda da kolonize olabilmektedir. Çoğunlukla

ekstrasellüler bir bakteri olan *Helicobacter pylori*'nin, özellikle kanser vakalarında hücre içine de lokalize olabildiği iddia edilmektedir; ancak henüz bakterinin hücre içine girdiğine dair bir kanıt yoktur (21). *Helicobacter pylori*'nin flagellalar; üreaz, katalaz, müsinaz, lipaz gibi enzimler; nötrofil aktive edici protein (NAP), dış membran proteini (OMP) gibi proteinler, lipopolisakkaritler (LPS), vaküole edici sitotoksin A (VacA) toksin ve sitotoksin-assosiyasyon gen A (CagA) toksin gibi birçok virülans faktörlerine sahip olduğu ve bu faktörler aracılığı ile patojenik etki gösterdiği bilinmektedir (22).

*Helicobacter pylori*'nin dünya popülasyonunun %50'sini infekte ettiği ve dünya genelinde kanser nedenli ölümlerde ikinci sırada yer alan gastrik kanserlerin başlıca nedeni olduğu belirtilmektedir (23). *Helicobacter pylori*, kronik gastritin ana nedeni olup, gastrik ülser, duodenal ülser ve gastrik kanserlere neden olan biyolojik ajanların başında gelmektedir (24). Yapılan çalışmalar dünya genelinde gastrik kanser ve MALT lenfoma vakalarının yaklaşık %70'nin doğrudan *Helicobacter pylori* infeksiyonundan kaynaklandığını göstermiştir. *Helicobacter pylori* infekte bireyler genel olarak asemptomatik olabilirler; ancak hastaların yaklaşık %20'sinde preneoplastik değişimler gelişmekte ve yine infekte bireylerin %1'inde kanser gelişimi görülmektedir. Çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel çalışma, kronik *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile gastrik kanser ve MALT lenfoma arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiş ve IARC 1994 yılında *Helicobacter pylori* infeksiyonunu "Grup 1 karsinojen (insanda kesin karsinojen)" olarak sınıflandırmıştır (21).

Kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik kanserlerin başlıca etkeni olan *Helicobacter pylori*'nin oral-oral ve feka-oral yolla bulaştığı bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'nin *Helicobacter pylori* ile infekte olduğunu ve gelişmiş ülkelerde bu oranın daha düşük olmasına rağmen dünya popülasyonunun hemen hemen % 50'sinin infekte olduğunu göstermektedir. 2015 yılında yapılan bir global prevalans çalışmasına göre dünya genelinde *Helicobacter pylori* ile infekte yaklaşık 4,5 milyar kişi oldu bildirilmiştir. Afrika nüfusunun infeksiyon açısından %79,1 ile birinci sırada yer aldığı; Afrika'yı % 63,4'lük oranla Latin Amerika ve Karaiblerin izlediği ve % 54,7 oranla ise Asyanın üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir. Endüstrileşme oranının yüksek olduğu batı dünyasında prevalans düşmekte iken, gelişmekte olan ülkelerde prevalans hala yüksek

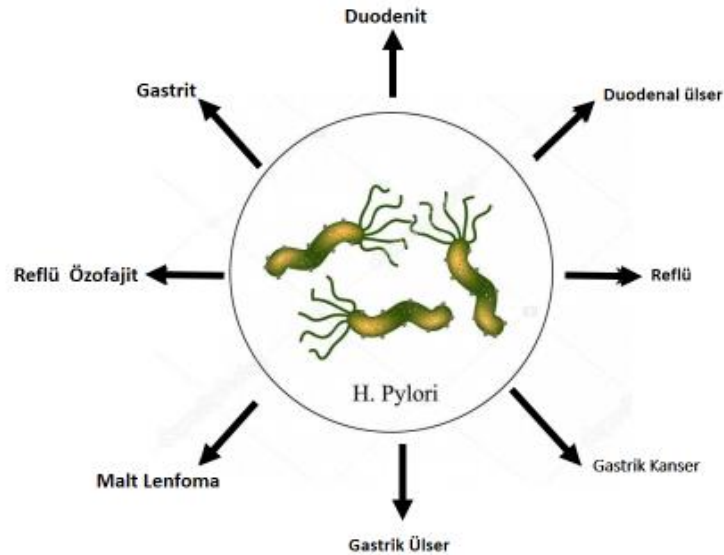
olup, genel olarak sosyoekonomik durum ve hijyeniteye bağılı olarak değişmektedir. Yapılan alışmalarda *Helicobacter pylori* infeksiyonu insidansının pek çok ülkede yaşam standartlarının iyileştirilmesi sonucuna bağılı olarak azaldığı gösterilmiştir (20, 24,25).

*Helicobacter pylori*'nin bulaşması konağın sağlık durumuna ve sosyoekonomik durumuna bağılı olarak değişkenlik göstermektedir. Aile-içi bulaş (zellikle anne-ocuk arasındaki bulaş) en yaygın bulaşma yolu olmasına rağmen, hijyenik koşulların düzelmesine bağılı olarak bu oran azalmaktadır. *Helicobacter pylori* infeksiyonunun aileden çocuğa vertikal yayılımın en yaygın yol olduğu bildirilmiştir. İran'da yapılan bir filogenetik çalışmada, 30 vakadan 26'sında fekal örneklerden elde edilen *Helicobacter pylori*-DNA örneklerinde vertikal bulaşın %46,1'nin ailesel yolla olduğu, bunun % 38,4'nn anneden ve %7,7'sinin ise babadan kaynaklı olduğu gösterilmiştir. Kedilerle ilgili yapılan bir çalışmada ise *Helicobacter pylori* ile infekte kedilerde 14. haftada yavru kedilerin de pasif olarak infekte oldukları gösterilmiştir (20).

*Helicobacter pylori*-insan ilişkisi en az 100.000 yıllık bir geçmişe dayanmaktadır. *Helicobacter pylori*'nin Afrikadan glerle yayıldığı, evrimleştiği ve bu süre içinde, konak-adaptif immün yanıtı gelişmesine rağmen, bakteriyel bir adaptasyon mekanizmasının da geliştiği bilinmektedir. Bu bakteriyel adaptasyon sürecinde, yeni *Helicobacter pylori* genom sekanslarının dolayısıyla da yeni *Helicobacter pylori* suşlarının geliştiği bilinmektedir (20,25). Yapılan alışmalar, konakta gelişen *Helicobacter pylori* infeksiyonunda tek bir bakteri suşunun baskın olduğunu ve çoklu infeksiyonun daha nadir olduğunu göstermiştir. Gastrointestinal ortama adaptasyonda diyet ve farklı bakteri kolonizasyonlarının da farklı ekofizyolojik koşullar oluşturduğu ve bunların da adaptasyona etki edecek spesifik bakteri özellikleri oluşturabileceği bilinmektedir. Örneğin, farklı allellere sahip bakteri virülans faktörlerinin oluşması ya da mide motilesine adapte olabilen bakteri alt-suşlarının oluşması adaptasyonu güçlendiren faktörlerdir. Bunlara ek olarak diğer bir önemli faktör bulaşma yaşı olup, yaşamın ilk 5 yılında infekte olan bireyler tedavi edilmediklerinde yaşam boyu dirençli infeksiyona maruz kalabilmektedir (25).

Uzun yıllardır *Helicobacter pylori*'nin insanda kronik gastrit, peptik ülser ve adenokarsinoma gibi çeşitli patolojilere yol açma mekanizmalarıyla ilgili *birçok in*

*vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmış ve birçok veri elde edilmiştir (16). Gastrik kanserlerin ve MALT lenfomaların zemininde uzun süreli kronik gastrik inflamasyonun yatmakta olduğu bilinmektedir. *Helicobacter pylori* kaynaklı oluşan gastrit atropik gastrit, intestinal metaplazi ve displazi ve sonrasında difüz veya intestinal tip gastrik karsinoma şeklinde bir seyir gösterebilmektedir (Şekil 2.2.) (18,26). *Helicobacter pylori* gastrik kolonizasyonu genel olarak asemptomatiktir. *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrik mukoza hasarında doğrudan ve dolaylı pekçok faktör rol oynamaktadır. Konağın inflamatuvar cevabı, üreaz, kan grubu antijeni bağlayıcı adhezin toksini (BabA), VacA yada CagA gibi spesifik virülans faktörler gastrik epitelyal hücrelerde hasara ve gastrik mukosal bariyerin bozulmasına neden olmaktadır (19).

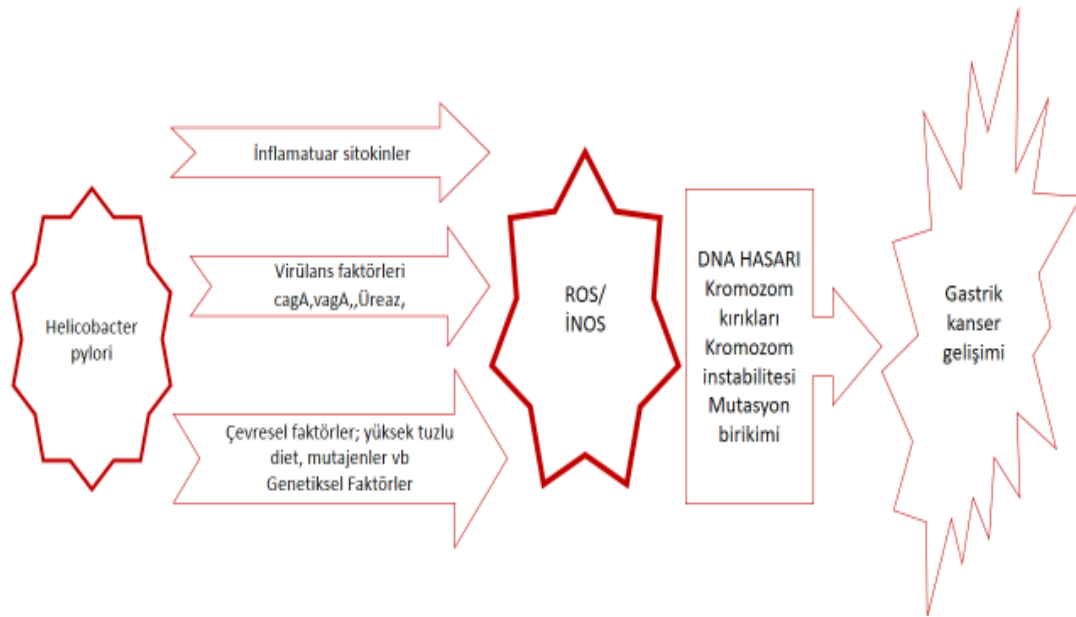


Şekil 2.2. *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu hastalıklar(18)

*Helicobacter pylori* enfeksiyonu ve adenokarsinoma arasındaki neden-sonuç ilişkisini gösteren pekçok çalışma mevcuttur. Moğol farelerle yapılan bir çalışmada *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun N-metil-N-nitrozamin (MNU) indüksiyonlu mide karsinogenezini artırdığı, sadece MNU verilen ve MNU+*Helicobacter pylori* ile enfekte grupların karşılaştırılması ile gösterilmiştir. Uzun süreyle (62 ve 72 hafta boyunca) *Helicobacter pylori*+MNU verilen farelerin 2/3'ünde gastrik neoplastik değişimler gözlenirken, sadece MNU verilen ya da sadece *Helicobacter pylori* ile

enfekte edilen gruplarda neoplastik bulgulara rastlanmamıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, *Helicobacter pylori* ile 24 haftalık inokulasyonun ardından farelerde atropik gastrit, intestinal metaplazi ve sonunda da karsinojenez gelişimi şeklinde çok adımlı bir sürecin ortaya çıktığı gösterilmiştir (27).

Gastritin ana başlatıcı etkeni *Helicobacter pylori* enfeksiyonu olup, erken dönemdeki hızlı progresyonun nedeni *Helicobacter pylori*'nin direçli olmasıdır. Ancak, daha sonra meydana gelen atropi *Helicobacter pylori*'den bağımsız olup daha çok genetik faktörler ya da mikro çevre (duodenogastrik reflü, intralümenal bakterinin aşırı çoğalması, nitroz bileşenlerin intragastrik alanda oluşumu) ve makro çevre (diet, tuz, ilaçlar, sigara/alkol kullanımı) gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Şekil 2.3.) (17).



**Şekil 2.3.** *Helicobacter pylori* ve gastrik karsinojenez gelişimi

### **Oksidatif stres**

Hücresinin enerji üretimi sırasında ya da normal metabolizma sürecinde ortaya çıkan kısa ömürlü reaktif atom veya moleküllere “serbest radikaller” denir. Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron bulundurlar



ve biyolojik makromoleküllerle ve mikromoleküllerle kolayca reaksiyona girerler (28).

Serbest radikallerden en önemlileri ROS ve RNS türleridir. ROS oldukça yüksek reaktivlikte olan yapılarında oksijen bulunduran organik ya da inorganik serbest radikaller veya peroksitlerdir (29). ROS, canlı organizmalarca endojen ve ekzojen faktörlerin bir sonucu olarak üretilir. Organizmada bulunan belli düzeylerdeki ROS/RNS organizma lehinedir. Örneğin, makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositik aktivasyonu sonucunda ROS oluşumu artar. Bu hücrelerde bulunan oksidaz enzimleri aracılığı ile çevresel patojenlere karşı hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hipokloröz asit gibi radikaller üretilir ve patojen savunmasında kullanılır (30). Mitokondrial solunum süreci, mikrozomal sitokrom P450 (CYP450) metabolizması, eozinofil, makrofaj, nötrofil hücrelerinin ve inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu, araşidonik asitin lipooksijenaz ve siklooksijenazlarla oksidasyonu sırasında yoğun bir şekilde ROS üretimi olmaktadır. Ultraviyole (UV) ışınları, ionize radyasyon, beslenme bozuklukları, vitamin ve mineral eksiklikleri gibi çeşitli etkenlerle ve ksenobiyotiklerin organizmaya girmesi ve biotransformasyona uğraması sonucunda meydana gelen oksidasyon reaksiyonları ile de ROS oluşmaktadır (31,32). ROS oldukça reaktif moleküller olup; nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi makromoleküllerde hasara yol açabilir ve bu moleküllerin işlevlerini değiştirebilir.

Homeostaz durumunda organizmada oksidan ve antioksidanlar bir denge halindededir. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması “oksidatif stres” olarak adlandırılır. Oksidatif dengenin bozulması durumunda hücrel indirgenme potansiyeli bozulur ve peroksitler ve serbest radikaller hücrel proteinlerde, DNA’da veya lipitlerde hasara yol açabilir (33).

Hücrelerin ROS üretimlerinin dengelenmesinde antioksidan enzimler görev almaktadır. Bu enzimlerden en önemlileri katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz 1, 2 ve 3 (SOD1,SOD2,SOD3)’tür. Ayrıca C vitamini, E vitamini, karotenoidler gibi küçük antioksidan moleküller de oksidan/antioksidan dengenin korunmasında destek görevi görmektedirler (34).

Oksidatif stres hücrel indirgenme mekanizmalarında ortaya çıkan değişimlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Hücrede meydana gelen hasarlar

düzeltilemediğinde hücre ölümü meydana gelir. Hasar derecesine bağlı olarak hücre ya apoptoza ya da nekroza gider (33).

Oksidatif stres nicel olarak tespit edilmesi zor karmaşık bir süreçtir. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan başlıca biyogöstergeler şunlardır;

- ✓ Antioksidan enzim aktiviteleri [CAT, GPx, SOD, glutatyon redüktaz (GR), tiyoredoksin redüktaz (TrxR)]
- ✓ Doğrudan hücre içi ROS/RNS ölçümü
- ✓ Total antioksidan kapasite (TAOC)
- ✓ Redükte/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı
- ✓ Lipit oksidasyon ürünleri (malondialdehit, tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri, konjugedienler vb.)
- ✓ Protein oksidasyon ürünleri (nitrozaminler, karbonil grupları)
- ✓ DNA oksidasyonu [8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)]
- ✓ Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GSH, flavonoidler, karotenoidler, C ve E vitaminleri) (35)

### **Antioksidan Enzim Aktiviteleri**

Süper oksitdismutaz, süperoksit serbest radikalının moleküler oksijen ( $O_2$ ) ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. İnsanda sitozolik süperoksit dismutaz (SOD1, CuZn-SOD), mitokondrial süperoksit dismutaz (SOD2, Mn-SOD) ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (SOD3, EC-SOD) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır (36).

Katalaz,  $H_2O_2$ 'nin  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya yıkımını katalizler. Antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşenidir. Hücre içinde %20 sitozolde ve %80 peroksizomlarda bulunmaktadır. CAT ayrıca metanol, etanol, formaldehit ve formik asit gibi hidrojen vericileriyle reaksiyona girerek peroksidaz aktivitesi de gösterir (37).

Glutatyon peroksidazlar, hemoglobin oksidasyonunda ve eritrositlerin hemolizinin önlenmesinde görev alan bir antioksidan enzimlerdir. Aktif bölgesinde selenyum içerip içermemesine göre selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olarak iki gruba ayrılırlar. Selenyum bağımlı GPx'ler hücrelerin antioksidan savunmasında kilit role sahiptirler. GSH, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek GSSG ve su oluşturur ve böylelikle eritrositlerden hidrojen peroksitin uzaklaşmasını sağlar. Bu

reaksiyon sonucunda hidrojen peroksitin hidroksil radikaline dönüşmesi ve lipit peroksidasyonu oluşumu da engellenmiş olur (38).

### **Total Antioksidan Kapasite (TAOC)**

Organizmada bütün antioksidanların toplam etkisini “total antioksidan kapasite (TAOC) yansıtır. Hücrelerde antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu antioksidanların aralarında sinerjistik bir etki vardır; antioksidan moleküllerin bir arada etki etmesi sonucu her birinin tek başına oluşturduğundan daha fazla antioksidan etki oluşmaktadır. Bu nedenle vücuttaki oksidan-antioksidan dengesinin belirlenmesinde TAOC ölçümü önemli bir parametredir (39).

### **Glutasyon**

“ $\gamma$ -Glutamil Sisteinil Glisin” yapısında atipik bir tripeptit olan glutasyon antioksidan olarak önemli fonksiyonlara sahiptir. L-sistein, glisin ve L-glutamik asitten sentezlenir. Organizmalarda okside ya da redükte haldedir. Önemli fonksiyonlara sahip bir antioksidan moleküldür (40).

Glutasyon başlıca şu reaksiyonlarda aktif rol oynar;

- Ksenobiotiklerin detoksifikasyon reaksiyonlarında
- İzomerizasyon reaksiyonlarında kofaktör olarak
- Sisteinin taşınmasında ve depolanmasında
- Proteinlerin sülfidril gruplarının redükte formda kalmasında
- Hücre çoğalmasında (40)
- Glutasyonun oksidatif stresteki rolleri ise şöyle özetlenebilir;
- Glutasyon S-transferaz (GST) ve GPx enzimlerinin kofaktörüdür.
- Hidroksil radikali ve singlet oksijenini doğrudan detoksifiye eder.
- Hücre membranından aminoasit taşınımında görev alır.
- Non-enzimatik antioksidanlar olan C vitamini ve E vitaminini yeniden aktif formlarına dönüştürebilir.
- Apoptoza karşı koruyucu özelliklere sahiptir (41,42) .

### **Lipit Peroksidasyonu**

Oksidanların karbon-karbon bağı içeren membran lipitlerinden elektronların koparılması olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif hasar sonucunda meydana gelen membran bütünlüğündeki bozulma membran yapısında hasara ve dolayısıyla membran fonksiyonlarında değişikliklere yol açmaktadır. Lipit peroksidasyonu membran akışkanlığının değişmesi, H<sup>+</sup> ve diğer iyonlara geçirgenliğin artması, membran potansiyelinin azalması, membran yırtılmalarıyla lizozomal hidrolitik enzimlerin ve hücre içeriğinin hücre dışına geçmesi gibi pek çok olumsuz etkilere neden olabilmektedir (28).

Malondialdehit (MDA), 4-hidroksialkaneller (4-hidroksi-2-nonenal), akrolein ve lipit peroksitler (LOOH) lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan ikincil ürünlerdir. Bu ikincil ürünlerin hücre mebranından sızma ve hücre ölümü gibi toksik etkilere sahip oldukları bilinmektedir (28,43). MDA, hücre membranlarında bulunan hidroperoksitlere etki ederek iyon geçirgenliğinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre zarının geçirgenliği bozulmakta ve hücre zarı H<sup>+</sup> iyonlarına karşı daha geçirgen hale gelmektedir. Hücre zarının geçirgenliğinin bozulması ise, zarın bütünlüğünün bozulmasına, hücre lizisine ve sonuç olarak da hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. Ayrıca, MDA'nın DNA ve diğer önemli makromoleküllerde de hasara yol açtığı bilinmektedir. Tüm bu etkilerinden dolayı MDA lipit peroksidasyonunun en iyi biyogöstergelerinden kabul edilmektedir (44,45).

### **Protein Oksidasyonu**

Hücre içinde ROS üretimine yol açabilen tüm ajanlar ve reaksiyonlar protein oksidasyonuna da neden olabilirler. Protein oksidasyonu, peptit zincirinde fragmantasyon, hücrede elektriksel yüklerde değişim, amino asitlerde bölgesel modifikasyonlar, enzim aktivitesinde değişiklikler, membran hasarları gibi farklı mekanizmalarla meydana gelebilir (46). ROS hücredeki proteinler üzerinde oksidatif değişikliklere yol açarak hücre hasarına neden olmaktadır. ROS'un neden olduğu bu değişikliklerden en önemlisi karbonil gruplarının oluşumudur ve bu grupların miktarının belirlenmesi protein oksidasyon düzeyleri hakkında bilgi verebilmektedir (47).

## **Oksidatif DNA Hasarı**

Serbest radikallerin DNA üzerinde oluşturduğu hasarlara “oksidatif DNA hasarı” adı verilmektedir. DNA da meydana gelen oksidatif hasarlar DNA’yı oluşturan baz, şeker ya da nükleotitleri etkileyebilmektedir. DNA hasarları, DNA onarım mekanizmaları ile düzeltilmektedir. Ancak, bazı durumlarda bu hasarlar tamir edilemekte ve karsinogenez, mutagenез ve yaşlanma gibi olaylar meydana gelebilmektedir (28,48).

Hidroksi radikalinin ( $\cdot\text{OH}$ ), DNA’daki guanin molekülünü oksidasyonuna yol açması en önemli oksidatif DNA hasarlarındanıdır. Son derece reaktif bir bileşen olan bu radikalinin guanini okside etmesiyle 8-OHdG en sık oluşan DNA baz lezyonlarından biri olup DNA hasarlarının en iyi biyogöstergelerinden biridir (48).

DNA DSB’lerinin belirlenmesinde fosforile  $\gamma$ -H2AX çok sık kullanılan hassas biyogöstergedir. H2AX serin (Ser1) üzerinden fosforile edilebilen, lizin (Lys5 üzerinden) asetillenebilen ve Lys119’dan katlanabilen bir proteindir. Ancak diğer H2A’proteinlerinden farklı olarak DNA hasarında Ser139 üzerinden fosforilenecek  $\gamma$ H2AX proteinini oluşturur. Yapılan araştırmalar DSB’lerin oluşumunu takiben çok yüksek miktarlarda  $\gamma$ -H2AX sentezlendiğini göstermiştir. DNA onarıldıktan sonra  $\gamma$ -H2AX fosforile edilir. Fosforile H2AX ( $\gamma$ -H2AX), hücre çekirdeğindeki DSB’ler için önemli bir gösterge iken, fosforile pan-H2AX (pan  $\gamma$ -H2AX) hücre çekirdeğindeki DSB oluşumu hakkında bir bilgi vermektedir (49,50).

## **Apoptoz**

Apoptoz mekanizması en iyi bilinen programlı hücre ölümüdür. Apoptozu sağlıklı çok hücreli organizmada meydana gelen ve canlılığın devamı için gerekli olan fizyolojik bir olaydır. Normal gelişme ve yaşlanma sırasında meydana gelebildiği gibi, immün reaksiyonlarda ya da hücrelerin hastalık yapıcı mikroorganizmalara veya zararlı ajanlara maruziyetinde de meydana gelebilir (42,51).

Hücre ölümüne neden olan temel faktörlerden birinin serbest radikaller olduğu bilinmektedir. Apoptoz temel olarak ekstrinsik yolak veya intrinsik yolak olmak üzere iki yolla başlatılmaktadır. Ekstrinsik yolak hücre dışından tetiklenir. varlığı ya da

büyüme faktörü yokluğu ile başlarken, intrinsik yolak hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum (ER) stresi ya da mitokondrial stres ile tetiklenir (51).

Ekstrinsik yolakla ya da intrinsik yolakla başlayan apoptotik süreçte “kaspazlar” adı verilen proteolitik enzimler görev alır. Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir (51).

Kaspazlar hücrede inaktif şekilde bulunurlar; ancak proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Bu enzimler başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) ve inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (52).

Apoptozun belirlenmesinde morfolojik görüntüleme yöntemleri (ışık, faz, elektron mikroskopu yöntemleri), immünohistokimyasal metodlar [terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick ucu etiketleme (TUNEL), kaspaz 3, anneksin], immünolojik yöntemler [enzim-bağlı immünosorban yöntemi (ELISA), florometrik yöntemler] kullanılmaktadır (53-55).

### **Otofaji**

Otofaji, hücre içi makromoleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek lizozomal enzimlerle parçalanmasıdır. Metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, morfogenez, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynamaktadır (56) .

Otofaji, evrimsel olarak korunmuş bir katabolik süreçtir ve hasarlı organeller veya uzun ömürlü proteinler gibi kargonun parçalanması yoluyla homeostazı sürdürür. Organel hasarında uzun ömürlü proteinler ve protein agregatlarını uzaklaştırmak, besin ve büyüme faktörü eksikliği gibi hücresel strese yol açan durumlarda aktive olur. Otofaji, oksidatif stres, infeksiyonlar, açlık ve bazı sitotoksik ilaçlar gibi çeşitli koşullara yanıt olarak uyarılabilir (57) Otofaji, hücresel strese yanıt ve hücrenin savunma mekanizması olarak düşünülebilir.(58)

Otofajide, otofagozom veya otofajik vakuol olarak bilinen çift veya daha fazla membran yapıları oluşur. Otofaji en az beş adımda gerçekleşmektedir:

- 1) İndüksiyon
- 2) Genişleme

- 3) Tamamlama
- 4) Yapışma ve füzyon
- 5) Degredasyon. (56)

Otofajide görev olan pek çok protein ailesi vardır. Dış mitokondriyal membranda bulunan B-hücre lenfoması proteinleri (Bcl-2 ailesi üyeleri) otofajiye etki eder. BECN1 geni, otofajiyi düzenleyen Beclin1 proteinini kodlar. Bcl-2, Beclin-1 gibi anahtar otofajik proteinlerle doğrudan ilişkiye girerek otofajinin düzenlenmesinde rol oynar. Beclin-1'in azalmış düzeylerinin, otofajiyi inhibe ettiği, ROS üretilmesine ve genotoksik strese neden olduğu düşünülmektedir (59,60).

Mikrotübül-assosiyasyon protein 1A/1B hafif zincir 3BLC3 proteini (LC3), MAP1LC3B geni tarafından kodlanır. LC3, ubikuitin ile yapısal homolojiyi paylaşır ve bu nedenle ubikuitin benzeri bir protein olarak adlandırılır. Bax proteini, ROS'un birikmesine, lipid peroksidasyonuna ve plazma membran değişikliklerine neden olarak hücreyi ölüme götürmektedir. Otofaji sırasında otofagozomlar, organeller de dahil olmak üzere sitozolik komponentleri yutarlar. Ardından LC3'ün fosfatidiletanolamin ile konjugasyonu ile lizozomal birleşmeyi sağlayan LC3-2 formu oluşur. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesi ile degredasyon işlemi gerçekleşir. Bundan dolayı LC3-2, otofajik aktivasyonun göstergesi olarak sık kullanılan bir biyogöstergedir (59-61).

Otofajide görevli bir diğer protein p62 olup otofajik hücre ölümündeki sinyal yollarında reseptör görevi görmektedir. Bundan dolayı otofajik hücre ölümünün belirlenmesinde etkili bir biyogösterge olarak kullanılmaktadır (60,62,63).

## **2.2. *Helicobacter pylori* İnfeksiyonunun Patogenezi**

*Helicobacter pylori* infeksiyonu ve patogenezi farklı mekanizmalar sayesinde midedeki asidik ortama adapte olacak şekilde düzenlemiş olup; gastrik mukoza bariyerinin zayıflatılması, mide duvarına çeşitli moleküller aracılığı ile adhezyon, oksidatif stresten korunma, gastrit ve inflamasyonun indüksiyonu, ülser oluşumu ve gastrik kanserin indüksiyonunun şeklinde bir seyir izleyebilmektedir (17).

*Helicobacter pylori*'nin en dış tabakası diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi çeşitli LPS'ler ve süperfasial antijenler içeren lipopolisakkarit tabaka ile çevrelenmiştir. *Helicobacter pylori* zincirlerinde değişkenlik gösterebilen bu tabaka,

çeşitli endotoksinlere sahip olabilmektedir. Bu da bakterinin patogeneziinde rol oynayabilmektedir (15). LPS, insan kan gruplarına yapıca ve immünolojik açıdan benzerlik gösteren fukozillenmiş oligosakkarit antijenleri içermektedir. Bu bakteriyel antijenler (Lewis antijenleri) adhezyon ve kolonizasyonun yanı sıra immün yanıtta da etkin rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda Lewis antijen ekspresyonunun bakterinin epitel hücre içine integrasyonunu artırdığı ve aktif olarak CagA'dan bağımsız olarak epitelyal ve immün hücrelerde nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve interlekin 8 (IL-8) üretimini artırdığını göstermiştir (19,64).

*Helicobacter pylori*, mikroaerofilik bir bakteri olduğu için yüksek O<sub>2</sub>'li ortamını tolere edememekle beraber O<sub>2</sub>'i terminal elektron alıcısı olarak kullanmakta ve yaşaması için en az %2 oranında O<sub>2</sub>'ye gereksinim duymaktadır. İnsan gastrointestinal sisteminde immün yanıt sonucu oluşan oksidatif stresse karşı demir-kofaktörlü süperoksit dismutaz (SOD-B), peroksit stresine karşı katalaz (CAT-A) ve alkil hidroksiperoksidaz redüktaz (Ahp-C) gibi çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir (19).

Asidik gastrik mukozada kolonize olan *Helicobacter pylori*, gastrik ortamdaki pH'yı salgıladığı üreaz enzimi ile yükselterek ve flagellası ile mide duvarı mukozasının iç tabakalarına hareket ederek adapte olmaktadır (20). Aminoasitler ve üre gastrik ortamdaki nitrojenin iki ana kaynağıdır. Nitrojen metabolizmasında ve asite dirençte anahtar rol oynayan amonyağı *Helicobacter pylori*'nin çeşitli şekillerde özellikle de üreaz enzimi için ana kaynak olarak kullandığı bilinmektedir. *Helicobacter pylori*'nin total protein içeriğinin %10'una karşılık gelecek kadar büyük miktarda üreaz ürettiği ve bunun için de gerekli olan amonyağı çeşitli kaynaklardan kullandığı gösterilmiştir (19).

*Helicobacter pylori*, oksidatif stresse karşı koyabilmek için antioksidan enzimlerin yapısında bulunan nikel, demir, bakır ve kobalt gibi kofaktörlere gereksinim duymaktadır. Ayrıca metabolizmasında görevli enzimler için de bu kofaktörlere ihtiyaç duyar. Bu kofaktörlerden nikel essansiyel kolonizasyon faktörü olan üreaz ve hidrojenaz enzimi için gerekli olup, konağın sindirim ürünlerinden elde edilmektedir. Gastrik kolonizasyonda rol oynayan bir diğer metal demirdir. Çeşitli demir transport sistemlerine sahip olan *Helicobacter pylori* demiri gastrik mukozada hasarlı dokulardan ya da pepsin ile sindirilmiş besinler yoluyla elde ederek dış ve iç



membranlarında bulunan transport sistemleri ile hücre içine alır. Sitoplazmasında bulunan Pfr ferritin ve *Helicobacter pylori*-NAP bakterioferritin proteinleri aracılığı ile depolanarak gerektiğinde demir toksisitesine ve serbest demir aracılı oksidatif strese karşı bakteriyi korur (19,65).

### 2.2.1. Midedeki asidik ortama adaptasyon

Nötrofilik ve hareketli bir bakteri olan *Helicobacter pylori*, düşük pH'a maruziyetin etkilerini minimuma indirmek için, birçok adaptasyon mekanizması geliştirmiştir. Mide antrumundan fundusa kolonize olmak için hareket eden *Helicobacter pylori* için pH en önemli faktördür. Mide pH'sı bölgesel olarak ve midenin doluluk veya boşluk durumuna göre değişkenlik göstermekte olup, *Helicobacter pylori*, bu tür pH değişimlerini kemoreseptörleri sayesinde algılayabilmektedir. pH değişimlerinin kemoreseptörler ile algılanması sonrasında üreaz aktivitesi ve flagellalar sayesinde uygun ortamı sağlayan ya da uygun ortama yönelen *Helicobacter pylori* yaşamını devam ettirebilmektedir (17).

### *Helicobacter pylori* Kemoreseptörleri

*Helicobacter pylori* gastrik mukoza tabaksının derininde gastrik epitelyal hücrelerin yaklaşık 30 µm içinde dağılmış olup, histolojik olarak gastrik kriptlerin içinde gözlenmektedirler. Gastrik mukoza içinde lokalizyondaki direnç kemoreseptörleri ve flagellalarının adaptif davranışıyla sağlanmaktadır. Schreiber ve ark. (2004), *Helicobacter pylori* ile infekte Moğol farelerde yaptıkları bir çalışmada, bakterilerin belli bir pH gradyanına göre hareket ettikleri ve bu gradyanın olmadığı durumlarda bakterilerin gastrik mukus boyunca yayıldığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmada bikarbonat/CO<sub>2</sub> ya da üre/amonyak gradyanının bakteri hareketini değiştirmede gösterilmiş ve pH taksisinin diğer kemotaktik yanıtlat içinde en baskın yanıt olduğu iddia edilmiştir (66).

*Helicobacter pylori*'nin lokal asidite içersindeki sıcaklık değişikliklerinde taktik sinyal transdüksiyonu ile flagellar motorla bağlantı kurarak, optimal pH'da kaldığı ya da uygun pH'ya yöneldiği düşünülmektedir (30). Kemoreseptörleri sayesinde ortamdaki kimyasal değişimleri algılayarak, buna göre adaptasyon gösteren *Helicobacter pylori*'nin, TlpA, TlpB, TlpC ve TlpD olmak üzere 4 tip dönüştürücü

benzeri protein (transducer like protein, Tlp) yapısında kemoreseptöre sahip olduğu bildirilmiştir (68). TlpB, bu kemoreseptörler içinde en önemlisi olup transmembran reseptör monosit kemoatraktan protein (MCP) süperaillesinin bir üyesidir ve ekstrasellüler değişimlere (hipoksi, sirkadyan ritim değişiklikleri, hormonal uyarı, sinaptik plastisite değişimleri, ksenobiyotik stresi gibi) hassas Per-ARNT-Sim (PAS) domain içeren 2 adet transmembran heliks içerir. Bu domainin aktif kısmı üre ile birlikte ligandlar ve periplazmik proteinler arasındaki doğrudan veya dolaylı etkileşimlerin belirlenmesinden sorumludur (16). Croxen ve ark. (2006)'nın fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, TlpB kemoreseptörünün N-terminal periplazmik ve hepsidin proteini (HAMP) domainlerini içerdiği fare gastrik kolonizasyonunda etkili olduğu, pH taksisinde ve dolayısıyla enfeksiyonda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada, TlpA, TlpC ve TlpD kemoreseptörlerinin ise kolonizasyon ve pH kemotaksisi için gerekli olmadığı iddia edilmiştir (67). *Helicobacter pylori*'nin kemoreseptörleri tarafından pH miktarını algıladıktan sonra, çevresindeki pH'ı üreaz salınımı ile değiştirmek yoluyla ya da flagellaları aracılığıyla daha az asidik ortama hareket etmek yoluyla asidik ortama adapte olduğu bildirilmiştir (17).

### Üreaz Aktivitesi

Doğal ortamı insanda gastrik mukoza olan *Helicobacter pylori*, asidofilik bir bakteri olmadığından dolayı asit maruziyetine hassastır ve pH'sı yaklaşık 2-7 arası olan mukus tabakasının altında kolonize olmaktadır. *Helicobacter pylori*, salgıladığı üreaz enzimi ile mukus tabakasının hasarı sırasında ya da kişiden kişiye bulaş sırasında ani olarak kısa süreli düşük pH'ya maruz kaldığında ya da herhangi bir nedenle mukozanın asitli ortamlarında da canlılığını sürdürebilmektedir ve bu nedenle. üreaz enzimi *Helicobacter pylori* patojenezinde merkezi rol oynamaktadır (68-70). Yapılan çalışmalarda, *Helicobacter pylori* suşları arasında üreazın aktivite ve lokalizasyonunun değişkenlik gösterebildiği ve bu durumun da suşlar arasındaki virülansta farklılığına yol açabildiği gösterilmiştir (71).

Michaelis sabiti 4 mM olan *Helicobacter pylori* üreaz enzimi yaklaşık 550 kDa büyüklüğünde nikel içeren bir protein olup, 30 ve 92 kDa'luk UreA ve UreB adı verilen iki polipeptit zincirinden oluşmuştur. *Helicobacter pylori*'nin UreA ve UreB

genlerini içeren bir operon ile ve UreABIEFGH proteinlerini kodlayan ureAB genini içeren ikinci bir operona sahip olduğu bildirilmiştir (17,19).

Yapılan pekçok çalışma sonucunda, *Helicobacter pylori* üreaz aktivitesinin bakterinin kolonizasyonunu sağlaması, amonyak ve çeşitli yan ürünlerin oluşmasına neden olması ve hücre hasarına yol açmasından dolayı en önemli virülans faktörlerinden biri olduğu iddia edilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin üreaz aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda üreaz enziminin sitoplazmanın yanı sıra en dış membranda da bulunduğu, kolonize bakterilerin bir bölümünün otolizisi sonucu dış ortama salındığı ve kalan intakt bakterilerce yüzeye absorbe edildiği gösterilmiştir. (72)

Krishnamurthy ve ark. (1998)'nin *Helicobacter pylori* yaptıkları ile bir çalışmada, taze sub-kültürlerde erken log fazında üreaz güçlü bir şekilde sitoplazmada yerleşmişken log fazının sonlarına doğru enzimin önemli bir kısmının yüzeye ya da hücre dışına doğru dağıldığı, intraselüler üreazın bakterinin aside karşı direncinde tek başına etkili olamadığı, eksternal üreazın ise bakterinin lizisinde gerekli olduğu dolayısı ile *Helicobacter pylori* infeksiyonunun patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (72).

*Helicobacter pylori* yüzey üreazı gastrik ortamda bakterinin yaşaması için ortam pH'sını kendisi için uygun değerlere yükseltirken, serbest üreaz inaktiftir ve pH'ın 4'ün altına düştüğü durumlarda geri dönüşsüz olarak inaktive olmaktadır. Hücre içine ürenin transportu H<sup>+</sup> kapılı üre kanalını Ure1 tarafından kontrol edilir ve ortam asiditesi arttığında ürenin hücre içine alınımı hızlandırır (19). Ure1'in *Helicobacter pylori* iç membran proteini olduğu, gastrik pH 4'ün altına düştüğünde aktive olarak üreazın salınmasını ve böylelikle pH'ın uygun şartlara ayarlanmasını sağladığı gösterilmiştir. Salınan üreaz ile üreyi hidrolize ederek amonyak ve CO<sub>2</sub>'e dönüştürür; amonyak da midedeki hidroklorik asit (HCl) ile nötralize olarak ortam pH'sını artırır ve böylece bakteri için gerekli optimal koşul sağlanmış olur (69,73). Artan amonyak üretiminin sitotoksik etkili monokloramin gibi amonyak türevlerinin oluşmasına neden olduğu; bakteri motilitesini artırdığı ve konakçının fagositik savunmasını baskıladığı; dolayısıyla *Helicobacter pylori* patogenezinde etkili rol oynadığı bildirilmiştir. Üreazın patolojik potansiyelinin büyük çoğunluğu amonyaktan kaynaklanmaktadır. Üreaz aktivitesi sonucu oluşan CO<sub>2</sub> ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub>) de *Helicobacter pylori* patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda,

CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>)'in kimyasal reaktivitesini modüle ettiği; özellikle ONOO<sup>-</sup>'in CO<sub>2</sub> ile hızlıca reaksiyona girerek ONOO<sup>-</sup>'in nitrat (NO<sub>3</sub>)'e izomerasyonunu hızlandırdığı ve aynı zamanda ONOO<sup>-</sup>'nin nitrasyonunu ve oksidasyon potansiyelini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir. Örneğin CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> guanin ve tirozin gibi aromatik bileşiklerin oksidasyonunu baskırlarken, ONOO<sup>-</sup> indüksiyonu ile bu bileşiklerin nitrasyonunu artırabilmektedir (74).

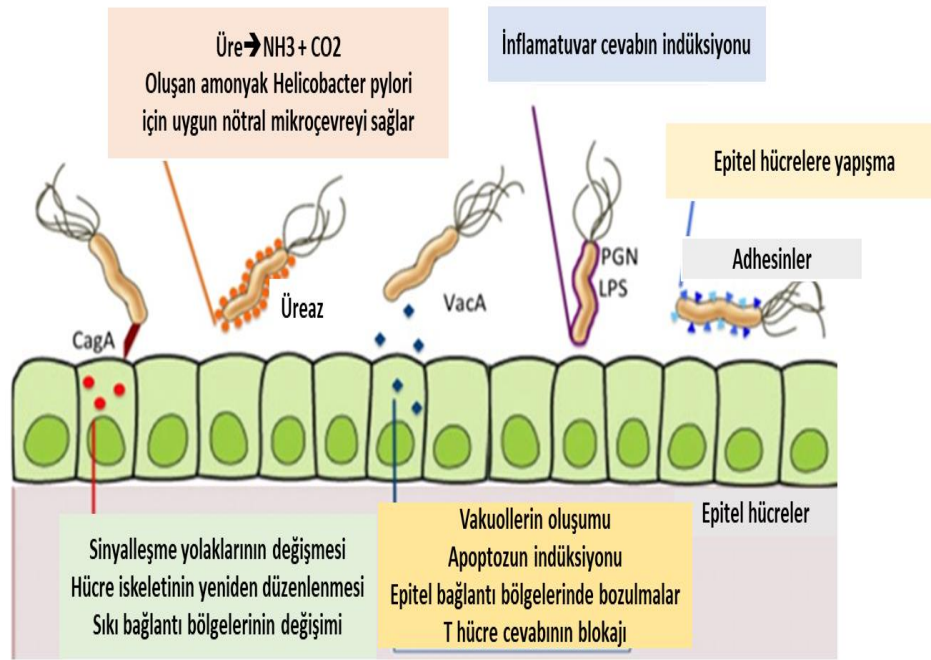
*Helicobacter pylori*'nin gastrik hücrelerde hücre hasarına yol açarak karsinogeneze neden olabileceği bilinmektedir. Çeşitli toksinlerin yanı sıra üreaz aktivitesi sonucunda oluşan amonyak ve asetaldehit gibi yan ürünlerinde bu karsinogeneze sürecindeki etkisi büyüktür (75). Amonyum hidroksit gibi üreaz aktivitesi sonucunda oluşan ürünlerin mukoza içindeki normal hidrojen ionları ile etkileşime girerek organizma tarafından lipazlar, proteazlar ve fosfolipazlar gibi çeşitli enzimlerin salgısına yol açtığı; bunun da mukozal bariyede ciddi bozulmaya ve doğrudan gastrik hücre hasarına yol açtığı bildirilmiştir (76). Yapılan birçok çalışma amonyağın gastrik epitel hücrelerde işlevsel ve morfolojik olarak birçok değişime yol açtığını göstermiştir. *Helicobacter pylori*'nin gastrik epitel hücrelerine adhezyonunu artıran amonyak, epitel hücrelerde nekroza ve hücreler arası sıkı bağların zayıflamasına neden olmakta, üreaz aktivitesi sonucu artan amonyak konsantrasyonu epitel hücre içine H<sup>+</sup> iyonlarının girişini azaltmakta ve geri pompalanmasını kolaylaştırmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ile artan amonyak miktarının inflamasyon sırasında amonyak moleküllerinin çeşitli kompleman inhibitörleri ile etkileşime girdiği ve ayrıca önemli aminoasitlerin sentezini bozarak sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (71).

### **Gastrik Mukozal Bariyerin Bozulması**

Gastrik mukozal bariyer başlıca; hücrelerarası sıkı bağlanma bağlantıları, çeşitli onarım mekanizmaları, mukozal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salınımı, epitelyal hücrelerin apikal uçlarında bulunan hidrofobik yapı, asit-baz dengesi, gastrik kan akışı, prostoglandinler ve bazal lamina aracılığı ile korunmaktadır. Gastrik mukozal bariyer, bu yapı ve mekanizmalar aracılığı ile gastrik asit, pepsin, safra ve pankreatik sıvı, belirli gıdalar, ısı değişimleri, hiperozmolar ve aşındırıcı maddeler, bakteriyel toksinler ve hasar yapıcı çeşitli ilaçlara karşı bir koruma kalkanı oluşturmaktadır. *Helicobacter pylori*'nin

mukoza bariyerde hasar oluşturma mekanizması üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve başta üreaz enzimi olmak üzere VacA, CagA ve inflamasyon sonucu salınan sitokinlerin mukus tabakasının hasarına yol açtığı gösterilmiştir. *Helicobacter pylori*, mukoza bariyerin hasar görmesi sonucunda kolayca kolonize olabilmekte ve epitel hücrelerine kadar yayılabilmektedir. Mukoza bariyeri aşan *Helicobacter pylori*, BabA ve sialik asit bağlayıcı adhezin (SabA) gibi çeşitli adhezinleri aracılığı ile epitelyal hücre membranındaki lipit ve karbonhidratlara adheze olabilmektedir (16,77). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* pek çok çalışma sonucunda *Helicobacter pylori*'nin kolonizasyonuna, adezyonuna ve konak hücrede hücre hasarına yol açan birçok virülans faktörüne sahip olduğunu gösterilmiştir (17,19,78) (Şekil 2.4).

### Gastrik lümen



Şekil 2.4. *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörleri (78)

## 2.2.2. *Helicobacter pylori*'nin Virülans Faktörleri

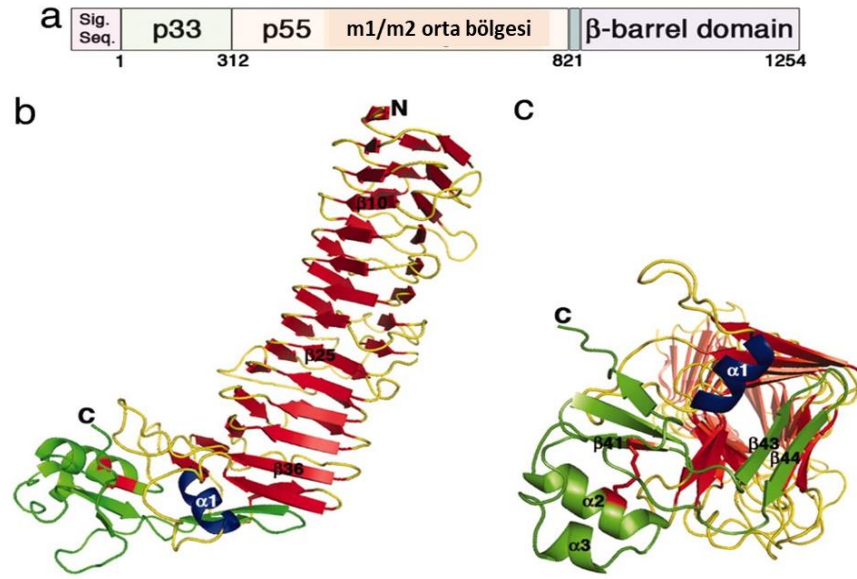
### Vaküole Edici Sitotoksin A (VacA)

İntrasellüler ve ekstrasellüler ortamda yaşayabilen *Helicobacter pylori*, hücre içine protein kinaz C ve fosfatidilinozitol gerektiren fermuar benzeri bir mekanizma ile girmektedir ve bu hücrelerde vakuolleşmeye neden olarak uzun süre yaşayabilmektedir (79). VacA, *Helicobacter pylori*'nin en önemli virülans faktörlerinden biri olup, gastrik epitel hücrelerinde vakuolleşmeye yol açmaktadır (17,80). VacA epitel hücre yapısında birçok etkiye sahiptir;

- infeksiyonun başlatılması
- membran permabilitesinin bozulması ile gastrik epitelyal bariyerin bozulması ve klorit iyonlarının sızması-
- immün cevabın modülasyonu (T-hücre cevabı)
- endozomal kompartmanın tahribi ile antijen sunumunun bozulması
- mitokondrial yapının bozulması ile transmembranal geçirgenlikte azalma
- sitokrom c, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonunda artış dolayısıyla apoptoz indüksiyonu
- ER stresi
- bakterinin otofajiyal işlevlerinin değiştirilmesi
- epitel hücrelerde oluşturduğu porlar aracılığıyla intraselüler geçirgenlikte artış; dolayısıyla besin maddeleri ve iyonların salınımına ve aynı zamanda üre ve anyon salınımında artışa neden olma (19,80-82).

Hücre tipi, hücre yoğunluğu, toksin konsantrasyonu VacA'nın toksisitesinde rol oynamaktadır (83). VacA'nın sitotoksik etkileri sadece gastrik epitelyal hücreler için tanımlanmasına rağmen salgılanan VacA'nın daha derin dokulara da penetre olabildiği; granülositler, monositler, B ve T lenfositlere de etki ederek antijen sunumunda ve T-hücre proliferasyonunda inhibisyona neden olabileceği düşünülmektedir (19).

VacA protein içeren bir sitotoksindir ve 860 aminoait rezidüsünden meydana gelen, 140 kDa ağırlığında uzun bir polipeptid zincirinden oluşmuştur (Şekil. 2.5.) (22, 80,84).



**Şekil 2.5.** VacA'nın moleküler yapısı (84)

VacA geni CagA'nın aksine tüm *Helicobacter pylori* zincirlerinde bulunmaktadır ve toksisite aktivitesi VacA genindeki sinyal bölgesi (s), orta bölge (m) veya araorta (i) bölgedeki allellerin farklılığından dolayı zincirler arasında farklılık gösterebilmektedir (85). VacA'nın her iki ucu sekresyon sırasında olgun bir protein olan 88-kDa'luk pre-protoksine dönüşür, sonrasında oto-taşıyıcı (Va) mekanizmasıyla oligomerik yapıda 33-kDa'luk N-terminal p33 ucuna ve 55-kDa'luk C-terminal p55 ucuna ayrılır (80,86). Proteolitik ayrılmaya rağmen, p33 segmenti en içte, p55 segmenti onun etrafına non-kovalan bağlanarak gül benzeri bir yapı oluşturur (19,87). Oluşan bu kompleks, konakçı hücre membrana yerleşerek  $\text{HCO}_3^-$  ve organik anyonların salınımı sağlayan anyon selektif bir kanal oluşturur. p55 segmenti kanalın oluşumu için esansiyel olmamasına rağmen, her iki segmentte konakçıya bağlanmak için şarttır. Bu kanalın bakterinin büyümesi için gerekli potansiyel metabolik substratların akışını sağlayarak, *Helicobacter pylori* kolonizasyonuna yardımcı olabileceği düşünülmektedir. p33 ve p55 kompleksi endositozla endozomların içine girerek geç endozomların içinde anyonların yayılmasına; dolayısıyla zayıf bazların birikerek suyu çekmesine ve böylelikle vakuol oluşumuna neden oldukları bilinmektedir (82,87). p33 ve p55 parçalarının her ikisi de toksin aktivitesi için gerekli

olup daha büyük olan p33 N-terminal (amino) ucu lipit membranlarda endojen klorit-selektif kanalların etkisini taklit eden anyon-selektif kanalları oluştururken, daha büyük olan p55 C-terminal (karboksi) ucu epitelyal hücrelere bağlanmaktan sorumludur (86). Amino ucundaki S bölgesinin S1 ve S2 olmak üzere 2 alt tipi vardır ve sinyal peptidinin bir bileşenini ve olgun proteinin N terminal ucunu kodlar. S1 tipte VacA'ya sahip *Helicobacter pylori* zincirleri aktif toksini sekrete eder ve yüksek oranda ülser ve gastrik kanser gelişimi ile ilişkilidirler (88-89). Orta (m) bölge 55-kDa'luk C-terminal alt ünitesini kodlar ve m1 ve m2 alt tiplerine ayrılmıştır. i bölgesi ise vakuolizasyonda aktif rol oynamaktadır ve i1 ve i2 olarak 2 alt gruba ayrılmıştır. VacA s1/m1 kimerik zincirlerinin, s1/m2 zincirlerine göre daha güçlü vakuolleşmeye neden olduğu, s2/m2 zincirlerinin ise herhangi bir vakuol yapıcı etkiye sahip olmadığı düşünülmektedir. Bu durum *Helicobacter pylori* zincirlerinin toksik etkileri arasındaki farklılığı açıklamaktadır (19,80-82). Vac A s ve m tiplerinin kombinasyonuna göre çeşitli alt tiplere ayrılan VacA'nın s2/m1nin tipi nadir görüldüğü; s1/m1 tipinin s1/m2 tipinden daha toksik etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19,80,81). Yine VacA s1/m1 ve s1/m2 tiplerinin yaygın olduğu bölgelerde gastrik adenokarsinoma hastalarının s1/m1 tipi ile daha yüksek oranda infekte oldukları bildirilmiştir (90).

Bu toksinin epitelyal hücre internalizasyonu plazma membranındaki lipit taşıyıcılar aracılığı ve endositozla gerçekleşmektedir ve hücre içine giren VacA hücre içinde farklı yerlerde birikebilmektedir (87). Vakuolizasyon, vakuolar adenozin trifosfaz (ATPaz), guanozin trifosfaz (GTPaz), Ras-ilişkili protein 7 (Rab7) ve dynamin gibi birçok faktörün dahil olduğu kompleks bir mekanizmadır (79). Bir glikosfingolipit bağlayıcı protein olan dolayısıyla da sfingomiyelin reseptörü kullanan VacA'nın hücre internalizasyonu tamamen plazma membranındaki lipit taşıyıcılara bağlıdır ve bu lipit taşıyıcılar sfingomyelin ve kolesterol gibi doymuş yağlardan zengin olup ekstrasellüler yüzeylerinde glikozilfosfotidilinositol (GPI) bağlı proteinler içermektedir. VacA epitelyal hücrelere sekresyon yoluyla ya da temas-bağımlı transfer yolu ile; reseptör protein tirozin fosfaz (RPTP), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), glikozilfosfotidilinositol protein-lipit reseptörü (GPI-R) gibi reseptörler ve lipit taşıyıcılar aracılığı ile epitelyal hücrelere aktarılmaktadır (85).Yapılan *in vitro* çalışmalarda, reseptör tip protein tirozin fosfaz'ın (RPTP) mukoza hücrelerinde



erozyona yol açmaktan sorumlu olduğu gösterilmiştir (80).VacA'nın hücre içine alınması ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve VacA'nın lipit taşıyıcılarda yerleşik bulunan RPTP  $\alpha$  ve  $\beta$ 'ya bağlanarak lipit taşıyıcıları aktive ettiği ve böylelikle de toksin oligomerizasyonunu ve kanal oluşumunu sağladığı; düşük dansiteli reseptör-bağlantılı protein-1'in (LRP1) ise VacA ile etkileşime girerek otofaji ve apoptozda rol oynadığı gösterilmiştir (86,91). VacA'nın hücre içine girmesini takiben Rab7 ile işaretli vakuoller yüksek miktarlara ulaşarak sabun köpüğü benzeri bir kalıbı oluşturmak üzere sitozole yerleşirler. VacA öncelikle endozom içine klorit iyonlarının akışını sağlarken vakuoller tip ATP-az (V-tipi ATPaz, V-ATPaz) enzimini aktive eder. Artan asidifikasyonla amonyum iyonları ve diğer zayıf bazlar artarak endozom içinde birikirler ve sonuçta ozmotik şişmeye neden olurlar (87). Diğer bir deyişle, VacA'nın biyolojik membranlarda anyon selektif kanal oluşturması sonucunda anyonik geçirgenlik artar ve V-ATPaz proton pompası aktive olur. Aktive olan V-ATPaz pompası ozmotik olarak aktif protonlanmış zayıf bazların hücre içinde birikmesine, endositik kompartmanlarda ozmotik şişmeye ve sonuç olarak da hücrelerde vakuollizasyona neden olur (86).VacA'nın vakuol oluşumu mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda V-ATPaz proton pompası aktivasyonunun aynı zamanda hücre içi  $Ca^{2+}$ , cAMP ve pepsinojen sekresyonunu artırdığını bunun da gastrik kanser gelişimine predispozan olabileceği gösterilmiştir (92).VacA gastrik epitelyal hücrelerde oluşturduğu anyon-selektif kanallar aracılığı ile kolonizasyonun yanısıra bakteri için gerekli pirüvat ve  $HCO_3^-$  gibi metabolik substratları da sağlamaktadır ve böylelikle toksin üreten zincirler için gastrik mukozal tabakanın besinden eksik çevresi için avantaj olmasının yanısıra,  $HCO_3^-$  gibi üreaz enzimi için gerekli olan substratların artmasına da olanak sağlamaktadır. VacA'nın anyon permabilitesini artırdığına ve membran depolarizasyonuna neden olduğuna dair pekçok çalışma yapılmıştır. Szabò ve ark. (1999)'nın HeLa hücreleriyle yaptıkları *in vitro* bir çalışmada, hücreler 37<sup>0</sup>C de 30 dakika süresince 0,5 ug/ml asitle aktive edilmiş VacA'ya maruz bırakılmıştır. Elektrofizyolojik ve farmakolojik incelemede VacA'nın HeLa plazma membranında anyon geçirgenliğini artırdığını ve membran depolarizasyonu meydana getirdiği tespit edilmiştir (93).

Son on yılda yapılan çalışmalar otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfojeniz, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin normal

ve düzenli işlemlerini sağladığını göstermiştir. Ayrıca, otofajinin, hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını da belirlenmiştir (95-96). Araştırmalar, otofajide görülen bozuklukların, kanser, infeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını belirtmektedirler (97). Yapılan çalışmalar *Helicobacter pylori* infeksiyonunun midede otofajiyi indüklediğini göstermiştir. Bu indüksiyonun da *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrik kanserleri tetikleyebildiğine dair bilgiler vardır (98,99).

Otofajinin özellikle infeksiyona karşı primer savunma mekanizmasında kritik rol oynadığı, intrasellüler patojen invazyonuna cevapta ve bakteriyel toksin varlığında stimüle olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar otofajinin *Helicobacter pylori* ile infeksiyonun kontrolünde ve VacA'nın toksik etkilerine karşı savunmada etkin role sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, uzamış infeksiyonlarda VacA otofajinin bozulmasına ve bu yolla antibakteriyel fonksiyonların inhibisyonuna yol açabilmektedir (99). Raju ve ark. (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada VacA'nın otofaji üzerindeki etkisi araştırılmış; uzun süreli VacA pozitif *Helicobacter pylori* infeksiyonunun atipik glandular hücrelerde (AGC) otofajik aktivitenin bozulmasına ve dolayısıyla hücrelerde ROS ve otofajide görev alan bir protein olan p62 birikimine neden olduğu tespit edilmiştir. Otofajinin AGC hücrelerinin VacA toksinine ilk cevapta indüklendiği ve sitoprotektif rol oynadığı, uzamış infeksiyonda ise VacA'nın otofajinin bozulmasına yol açtığı, uzun ömürlü proteinlerin degradasyonlarının azaldığı, p62'nin akümüle olduğu ve ROS seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, otofajinin hem tümör supresyonunu ve hem de tümör oluşumunu hızlandırıcı etkisi olduğu ve VacA'nın indüklediği otofajinin *Helicobacter pylori* patogenezisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, s1m1 VacA üreten *Helicobacter pylori* ile ve nonfonksiyonel s2m2 VacA üreten *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerden alınan gastrik epitelyum foveolar hücre biopsisi örnekleri karşılaştırılmıştır. VacA s1m1 genotipindeki infekte örneklerde p62 akümüülasyonunun daha yüksek oranda olduğu, otofajik disfonksiyonun ve ROS seviyelerinin de yine daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca p62 ekspresyon seviyelerinin gastrik inflamasyon derecesinden bağımsız olduğu ve bakteriyel faktörlerle daha çok bağlantılı olabileceği iddia edilmiştir (100,101). Otofajik defekti olan hücrelerde ROS seviyesinin yükseldiği, p62

akümülyasyonunun meydana geldiği ve ER şaperonunun ve mitokondrial hasarın oluştuğu rapor edilmiştir. İnflamasyonun kısıtlanmasında, doku hasarında ve genom instabilitesinde önemli fonksiyonları olan otofajik fagozomlar VacA ile uzun süren maruzuyette dejenere olarak hücre içinde birirmektedirler. Yapılan çalışmalarda, ROS'un otofaji indüksiyonu için gerekli olduğu ve N-asetil sisteinin otofajiyi önlemede etkin role sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, VacA'nın neden olduğu ROS'un NADPH oksidaz (NOX) ya da süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimleri aracılığıyla gerçekteşen farklı mekanizmalarla önlemediği gösterilmiş ve ROS'un VacA aracılı otofajide mekaniksel bir role sahip olduğu iddia edilmiştir (102) .

Son yıllarda *Helicobacter pylori* virölans faktörlerinin gastrik epitelyal hücrelerindeki apoptotik etkileri üzerindeki çalışmalar artış göstermektedir. *Helicobacter pylori*'nin indüklediği apoptoz mekanizmasını araştırmak amacıyla pek çok çalışma yapılmış ve VacA intoksikasyonunun yanı sıra üreaz, CagA ve LPS'lerin de apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Kat-3 ve N87 gastrik hücreleriyle yapılan çalışmada üreazın sınıf 2 majör histokompatibilite kompleks (MHC) moleküllerine bağlanarak apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Yine *Helicobacter pylori*'nin apoptoz ile ilişkisini araştıran bir çalışmada, *Helicobacter pylori*'nin hücre-yüzey reseptörü Fas-Fas ligandın ekspresyonunu artırarak ya da NF-kB transkripsiyonunu artırarak apoptozu indüklediği *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca, *Helicobacter pylori*'nin VacA'dan bağımsız olarak da Fas/farklılaşma kümesi 95 (cluster of differentiation 95, CD95) yolunu aktive ederek hücre ölümünü indüklediğine dair çalışmalar da mevcuttur (83, 89,103) .

Apoptoz programlanmış hücre ölümü tiplerinden biridir. Genetik olarak kontrol edilen çevresel etkenlere ya da gelişimsel sürece bağlı olarak hücrenin kendini öldürmesi olarak tanımlanmaktadır (104). Birçok çalışmada VacA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte edilen gastrik epitelyal hücrelerde apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. Cho ve ark.(2003)'nın yaptıkları *in vitro* çalışmada, AGC (yabani tip, p53 eksprese eden) ve kato3 (p53 mutant) hücre hatları kullanılmış ve bu hücreler 24 saat boyunca VacA toksinine maruz bırakıldıktan sonra apoptoza olan etkisi MTT ve floresans mikroskopisi ile belirlenmiştir. Ayrıca, VacA'nın hücre siklusuna olan etkisi akış sitometrisi ile, kaspaz-3 düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ve DNA fragmantasyonu da Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan

bu çalışma sonucunda rekombinat VacA'nın hem AGC hem de kato3 hücre serisinde p53'ten bağımsız olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, VacA'nın G1-fazında hücre siklusu blokajı yoluyla gastrik hastalıklara aracılık ettiği, p53, p21 ve Bax proteinlerinin up-regülasyonu ile AGC hücrelerinde ve kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla da her iki hücre serisinde apoptoza neden olabileceği belirtilmiştir (83).

VacA'nın vakuolleştirici ve apoptotik etkisinin amonyum gibi zayıf bazların varlığında daha potansiyelize olduğu düşünülmektedir. Cover ve ark.(2005)'nin VacA'nın apoptotik etkisiyle ilgili yaptıkları *in vitro* çalışmada amonyum klorit içeren veya amonyum klorit içermeyen besiyerlerinde VacA pozitif ve VacA negatif *Helicobacter pylori* suşları ile 24 ve 48 saat inkübe edilen gastrik adenokarsinoma hücrelerinde meydana gelen değişiklikler, DNA fragmentasyonu analizleri ile incelenmiştir. VacA pozitif *Helicobacter pylori* grubunun amonyum klorit içeren besiyerinde normal besiyerine göre çok daha belirgin DNA fragmentasyonuna yol açtığı, VacA negatif *Helicobacter pylori* grubunda ise amonyum klorit içeren ve normal besiyeri arasında belirgin bir fark olmadığı gösterilmiştir. Yine aynı gruplar apoptotik etki açısından incelendiğinde, VacA pozitif grupta her iki besiyeri grubunda da nükleozomal fragmentasyonlarda belirgin artış tespit edilirken, VacA negatif grupta her iki besiyeri grubunda da anlamlı bir nükleozomal fragmentasyona rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, VacA'nın hem vakuol etkisinin hem de apoptotik etkisinin ortamdaki amonyum, amonyum klorit gibi zayıf bazlarla potansiyelize olabileceği iddia edilmiştir (90)

VacA'nın mitokondrial etkisi üzerine yapılan *in vitro* çalışmalar VacA ile inkübe edilen hücrelerde Vac'nın mitokondri endosomal kompartmanlardan Bax'a bağlanmak yoluyla lokalize olabildiği ve kanal aktivitesiyle transmembranal potansiyelini azaltarak, depolarizasyonu stimüle ederek, sitokrom-c salınımı, Bax ve Bak aktivasyonu ve mitokondri fragmentasyonuna yol açtığı, ayrıca indirekt olarak da pro-apoptotik faktörleri aktive ederek mitokondrial-bağımlı apoptoza neden olabildiği tespit edilmiştir (87,105). Ashktorab ve ark. (2004) *Helicobacter pylori*'nin gastrik epitelyal hücrelerdeki mitokondrilerin longitudinal şekillerini bozarak ve 1-2 µm çapındaki küresel şekle dönüştürerek bu parçalara integre olduğunu göstermişlerdir (106).

Yapılan çalışmalar memeli hücrelerinde VacA'nın mitokondrial fragmentasyonu hedeflediğini ve mitokondriye endojen bağlanmayı düzenleyen dynamin bağlantılı protein (Drp1)-GTPaz'ı aktive ederek integre olduğunu göstermiştir. Ancak, gastrik AZ-521 epitelyal hücre serisi ile yapılan çalışmalarda Drp-1'nin tek başına mitokondrial fragmentasyon için yeterli olmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda VacA'nın mitokondrial membran potansiyelini azalttığı ve Bax'ı aktive ettiği de bildirilmiştir. VacA'nın mitokondriye integrasyonunun otofajiye neden olmasının yanısıra; Bax aktivasyonuna, sitokrom-c salınımına ve ROS artışına neden olduğu ve bu yolla FAS/CD95 aracılı apoptozu indüklediği Rudi ve ark. (1998)'nin yaptıkları çalışmalarla gösterilmiştir (87,107).

Mitokondrinin bütünlüğü iç ve dış membranlarının bütünlüğü ile bağlantılı olup, artan geçirgenlik iç membranın depolarizasyonuna, bu da membran potansiyelinin ve metabolizmanın bozulmasına neden olurken, dış membrandaki geçirgenlik artışı iç membran boşluğundan sitozole pro-apoptotik efektörlerin salınımını indüklemektedir (87). Kimura ve ark. (1999)'nin yaptıkları bir çalışmada VacA'nın AZ-521 gastrik hücre serisindeki mitokondrial membran potansiyeli ve ATP seviyelerine olan etkisi araştırılmış ve maruziyet süresine bağlı olarak ATP seviyelerinin belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir. Bu çalışmada 120 nm konsantrasyondaki VacA,  $4,0 \pm 0,1 \text{ nmol}/10^6$  hücre konsantrasyonunda 6 saat, 12 saat ve 24 saatlik süreler için inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda VacA'nın mitokondrial membran potansiyelinde belirgin azalmaya neden olduğu ve ATP seviyelerinin 6 saat için %20, 12 saat için %35 ve 24 saat için % 50 oranlarında azaldığı tespit edilmiş ve VacA'nın AZ-521 hücrelerinde O<sub>2</sub> tüketimini inhibe ettiği iddia edilmiştir. Morfolojik açıdan incelendiğinde VacA'nın vakuol oluşumuna neden olduğu hücrelerde, hücre büyüklüğünde artış olmasına rağmen sitoplazmik hacimde azalmanın meydana gelmediği görülmüştür. Yine aynı çalışmada, VacA'nın AZ-521 gastrik hücre serisinde hücre siklusuna olan etkisi incelenmiş ve G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında %10 oranında uzama belirlenmiştir ve VacA'nın hücre siklusunun G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında etkili olabileceği öne sürülmüştür (92).

Yapılan pek çok çalışma sonucunda, VacA intoksikasyonu sonucu oluşan apoptotik hücrelerde hücre içinde mitokondrial sitokrom c'nin arttığı gösterilmiştir. Mitokondrial değişikliklerin VacA'nın vakuol oluşturmasının dolaylı bir sonucu

olduğu ya da hücre yüzeyi ile etkileşiminin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. *In vitro* çalışmalar, VacA'nın sadece p33 amino-terminal domaininin mitokondriye lokalize olabildiğini ve mitondrial iç membrana girerek iyon kanalı oluşturduğunu; membran depolarizasyonu, membran potansiyelinin bozulması ve ATP kaybı gibi olaylar zincirinin bunu takip ettiğini göstermiştir (108-109).

Mitofaji, mitokondrianın sekestre olarak otofagozom içine alınması olayı olup, bu tip hücre ölümünün mitokondrial potansiyel kaybı ile tetiklendiği düşünülmektedir. Fosfataz ve tensin analogu (PTEN) ile indüklenen kinaz 1 (PINK1), Parkin ve Nip-3 benzeri protein (NIX) gibi proteinlerinin mitokondri hasarıyla otofajik vakuoller içine alınmasında görevli olduğu düşünülmektedir. Normal koşullarda, PINK1 mitokondriye özgüdür; ancak proteolize uğrayarak mitokondride akümüle olması engellenmektedir. Mitokondriinin membran potansiyelini kaybettiği durumlarda ise, proteoliz inhibe olmakta ve PINK1 mitokondri yüzeyinde birikmektedir. PINK1'in mitokondri dış membranında birikmesiyle bir E3 ubiquitin ligaz olan Parkin aktive olarak mitofajinin başlamasını sağlar. Bu bilgiler doğrultusunda *Helicobacter pylori* ile infekte hücrelerde VacA'nın iyon geçirgenliğini artırmasıyla, mitokondrial membran potansiyelin kaybedilmesi ve sonuç olarak mitofajinin meydana gelebileceği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, *Helicobacter pylori* ile indüklenen ROS oluşumunun da mitofajiyi indükleyebileceği bildirilmiştir (87).

*Helicobacter pylori* ile infekte gastrik hücrelerde ROS oluşumundaki artışın inflamasyonun yanısıra çeşitli virülans faktörlerinden de kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle otofajinin zayıfladığı durumlarda önemli miktarda ROS birikimi dikkati çekmektedir. VacA'nın bir yandan otofajiyi tetiklerken bir yandan da ROS birikimine neden olduğu düşünülmektedir. İnfekte olan hücrelerde ROS'un başlıca iki kaynağı vardır; bunlar çevresindeki patojenleri öldürmek ve inaktive etmek için süpeoksit ( $O_2^-$ ) anyonları üreten NOX enzimi içeren makrofaj ve nötrofil plazma membranı ve önemli miktarda süperoksit salınımına yol açan mitokondridir. Mitokondri içinde,  $O_2^-$  büyük çoğunluğu solunum sırasında kompleks 1 ve 2 zincirindeki tekli elektronların  $O_2$ 'ya aktarımı sırasında meydana gelmektedir ve elektronların yaklaşık %0,1'i bu yolla solunum zincirinden geçerek  $O_2$ 'ye transfer olmaktadır. Uygun koşullar altında bu oranın % 1'e kadar çıkabildiği ve  $O_2^-$  nin ROS kaynaklı otofajiyi düzenleyen major bir ROS olabileceği düşünülmektedir (87,110).

*Helicobacter pylori* infeksiyonunda nötrofiller tarafından NOX'un aktivasyonu ile oluşan ROS, mitokondrilerde daha fazla birikmektedir ve bundan dolayı VacA'nın hem otofajiye, hemde apoptoza neden olduğu; her iki durumda da ROS birikiminde etkin rol oynadığı ve artan ROS miktarının mutajeneze yol açtığı düşünülmektedir (87). VacA'nın ROS oluşumuna neden olan diğer bir etkeni de hücre içi Ca<sup>+2</sup> alınımı indüklemesidir. Artan ROS'un NF-κB'yi aktive ederek proinflamatuvar immün yanıtın artmasına neden olduğu bildirilmiştir (111).

Son yıllarda yapılan çalışmalar VacA'nın gastrik epitelyal hücrelerinin yanısıra immün sistem hücreleri üzerine de toksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda VacA'nın T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, eozinofiller, mast hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller gibi birçok immün modülatör hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir; bu toksinin immunomodülatör etkiye sahip olduğu ve immün işlevler üzerinde neden olduğu bu değişikliklerin tümör gelişimini indükleyebileceği ileri sürülmüştür. VacA'nın immünosupresan etkisine ek olarak T-lenfositlerde yer alan ve proinflamatuvar etkiye sahip siklooksijenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu stimüle ederek aynı zamanda proinflamasyonu tetiklediği de bildirilmiştir (108). Yapılan çalışmalarda VacA'nın proinflamatuvar etkisinin gastrik kanser gelişiminde rolü olabileceği öne sürülmüştür (112). VacA'nın proinflamatuvar etkisinin mast hücrelerince salgılanan TNF-α ve interlökin 6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı stimüle etme ve yine bu hücrelerde kemotaksisi ve degranülasyonu indüklemesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. VacA'nın toksik etkilerinin çoğu gastrik epitelyal hücreler üzerindedir. Ancak, yapılan birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda salgılanan VacA'nın gastrik tabakanın lamina propiasını tahrip ederek daha derin dokulara da penetre olabildiği göstermiştir. Buradaki granülositler, monositler, B ve T lenfositlere de etki edebildiği ve bunun sonucunda antijen sunumu ve T-hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve bundan dolayı *Helicobacter pylori* patojenezinde önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (19,108).

VacA'nın T-lenfositler üzerinde pek çok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Jurkat T-hücreleri (immortal T-hücreleri) ile yapılan bir *in vitro* çalışmada, VacA'nın Jurkat T-hücrelerinin interlökin 2 (IL-2) üretimini ve optimal T-hücre aktivasyonu için gerekli olan T-hücre nüklear faktörünü (NFAT) ekstrasellüler sıvıdan hücre içine kalsiyum girişini bloke etmek yoluyla inhibe ettiği ve IL-2 yüzey reseptör

ekspresyonunu down-regüle ettiği gösterilmiştir (108,113,114). Primer insan CD4<sup>+</sup> T-hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise, VacA'nın NFAT aktivasyonu ve IL-2 ekspresyonu üzerindeki etkisinden bağımsız olarak da aktive T-hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (90,114).

### **Sitotoksin-Assosiyel Gen A (CagA) Toksini**

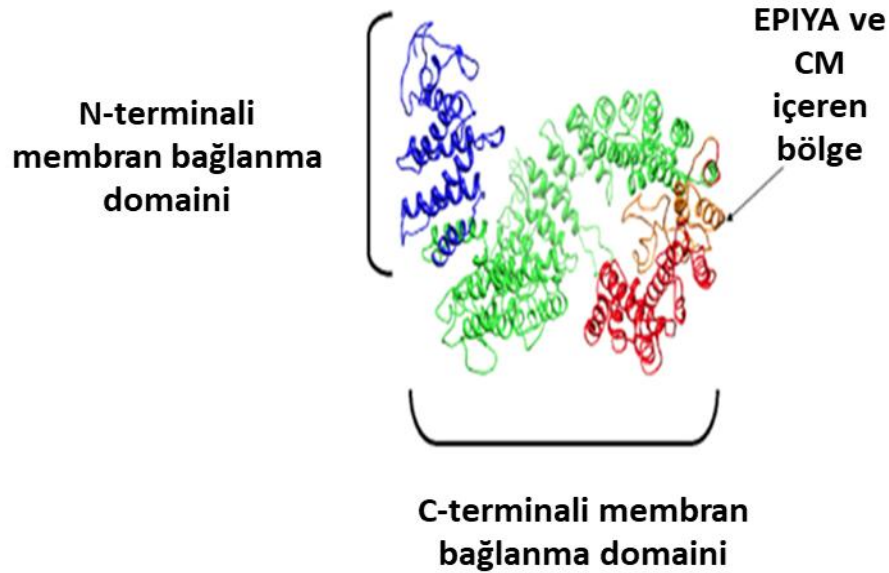
Yapılan klinik çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin sitotoksin asosite gen patojenisite adacığı (sCagPAI)'na sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, sCagPAI geninden eksprese olan CagA toksini bakteriyel sitotoksin olarak etki ettiği için isimlendirilmiş olsa da, asıl akut sitotoksiteye VacA'nın yol açtığı bildirilmiştir. CagA geninin varlığına göre *Helicobacter pylori* CagA pozitif ve CagA negatif subtiplerine ayrılmıştır. Yapılan çalışmalar CagA'nın karsinogenez gelişiminde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte Moğol farelerde yapılan bir çalışmada CagPAI adacıklarında yer alan CagA geninin atropik gastrit ve prekanseröz koşullar oluşmasına neden olacak şekilde bakterinin gastrik epitelyal hücreye kolonizasyonunu sağladığını göstermiştir (115). Transjenik farelerle yapılan bir başka çalışmada, sistematik bir şekilde CagA ekspresyonunun gastrointestinal karsinoma ve hematopoetik karsinogenez gelişimi için potansiyel bir onkoprotein olduğu gösterilmiştir (116). Zebra balıkları ile yapılan bir çalışmada CagA ekspresyonunun p53 geninde mutasyona yol açarak intestinal karsinogenez gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (114).

CagA tersiyer bir yapıya sahip olup, %70'i katı N-terminal kısmından oluşurken, geri kalan % 30 luk kısmını karboksi terminal (C-terminal) kuyruğundan oluşmaktadır. CagA proteini C-terminal bölgesindeki polimorfizme göre 130 ila 145 kDa büyüklüğündedir (116). CagA geni genomik DNA segmentinin bitiş kısmında bulunan 40 kb'lık CagPAI kısmına lokalize olmuştur ve tip 4 salgılama sistemi (T4SS)'ni kodlayarak hücre içine injeksiyonu sağlamaktadır. Batı ülkelerinden izole edilen *Helicobacter pylori* suşları %30-40'ı CagPAI taşımaz iken, Orta Asya ülkelerinden izole edilen suşların hemen hemen tamamı CagPAI'ya sahiptir. Suşa göre değişmekle birlikte, CagPAI'nın CagA da dahil olmak üzere tespit edilmiş 27 ila 31 gene (CagA, CagL, CagY vb) sahip olduğu düşünülmektedir (17,19,116). CagPAI tarafından kodlanmış 18 gen gastrik epitelyal hücrelere penetrasyonu sağlayan şırınga



benzeri bir yapıya sahip T4SS'yi etkileyerek CagA'nın, peptidoglikanların ve diğer bakterial faktörlerin konak hücre sine translokasyonunu kolaylaştırır (19). Ayrıca, *Helicobacter pylori*, gastrik epitelyal hücrelere BabA/B, SabA, dış inflamatuvar protein A (OipA), dış membran proteini (HopZ) ve adherens assosisye protein A ve B (AlpA/B) gibi adhezin molekülleri aracılığı ile tutunmasının ardından T4SS sistemi aracılığıyla konak hücrenin plazma membranındaki fosfotidilserine bağlanır. Bu işlem CagPAI tarafından kodlanan spesifik bir adhezin olan ve T4SS pilusunun yüzeyinde bulunan CagL ile gastrik epitelyal hücrelerde bulunan  $\alpha 1$  integrin proteininin interaksyonu yoluyla olmaktadır.  $\alpha 1$  integrinin aynı zamanda CagI ve CagY gibi diğer T4SS bileşenleriyle de interaksyona girdiği bilinmektedir. Polarize epitelyal hücrelerde integrin ekspresyonu bazolateral membran kompartmanlarında olmasına rağmen, apikal membrana bağlanan *Helicobacter pylori* integrinlerle bazolateral olarak interaksyona girmektedir. Yapılan çalışmalar, konakçı hücrenin plazma membranındaki fosfotidilserine bağlanarak C-terminal ucunda bulunan EPIYA (Glu-Pro-Ile-Try-Ala) motifindeki tirozin rezidülerinde konakçı hücre kinazları c-Src ve cAbl ile fosforillendiğini göstermiştir. Fosfo-CagA ile tirozin spesifik protein fosfataz non-reseptör tip 11 (SHP-2) ile bir kompleks oluşturarak tirozin fosfotaza şekillenir (Şekil 2.6). Bu kompleksin oluşması ile SHP-2'nin konak hücre membranında aktif hale geçer (19,115-122). Fosforile olan CagA daha sonra tirozin fosfataz SHP-2 gibi bir dizi konak sinyal molekülü ile interaksyona girerek epitelyal hücrelerde morfolojik değişimlere neden olur. CagA aracılı SHP-2 sinyali epitelyal hücrelerde polarizasyon kaybına neden olur iken, CagA ve SHP-2 arasındaki interaksyon fokal adezyon kinazın (FAK) defosforilasyonuna ve inaktivasyonuna; sonuç olarak da hücrelerde elongasyona neden olmaktadır (120). Backert ve ark. (2004)'nın yaptıkları bir *in vitro* çalışmada 75 (n=25) gastrit, peptik ülser ve gastrik kanser hastasından elde ettikleri *Helicobacter pylori* izolatlarında CagA ekspresyonu, translokasyonu ve tirozin fosforilasyonu, c-Src inaktivasyonu ve coractin defosforilasyonu Western blot, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve spektrofotometrik metotlarıyla araştırılmıştır. Bu çalışmada gastrit hastalarının %80'inde, ülser hastalarının %84'ünde ve gastrik kanser hastalarının % 84'ünde cagPAI geni pozitif bulunmuştur. Fosforile CagA %95 oranla en yüksek peptik ülser hastalarında bulunurken, bunu %81 oranla gastrik kanser hastaları ve %75 oranında ise gastrit hastaları takip etmiştir. Src'nin inaktivasyonunda

anahtar rol oynayan CagA fosforilasyonu incelendiğinde infekte gastrik hücrelerde Src aktivasyonunun çok güçlü bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bunun bir sonucu olarak coractin fosforilasyonunun da azaldığı görülmüş ve fosforile CagA'nın *Helicobacter pylori* patojenezinde etkin rol oynadığı ileri sürülmüştür.(120) Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, epitel hücrelere transloke olduktan sonra tirozin fosforilazla fosforile olan CagA'nın yanısıra, nonfosforile CagA grubunun da olduğunu belirlemiştir. Nonfosforile CagA'nın, c-Met/Ras sinyal yolundaki reseptöre bağlı büyüme faktörü 2 (Grb2)'ye bağlanarak etki gösterse de, fosforile CagA'nın daha güçlü patojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (119,121-124).



Şekil 2.6. CagA'nın moleküler yapısı (78)

CagA bakteriye karşı dirençte konak immün cevabın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (119). CagA'nın T-hücrelerinin apoptozunu indüklediği ve bu yolla immün yanıtı etki ettiği bildirilmiştir (19). Oldukça yüksek immünojenik etkinliğe sahip bir protein olan CagA'nın hücre içine enjeksiyonu ile hücre proliferasyonunda indüksiyon, polarite kaybı, hücre şekillerinde elongasyon, hücreler arası bağlantılarda bozulma, asit salınımında azalma, inflamasyon, motilite artışı, apoptoz gibi pek çok patojenik etki görülmüştür (17,121-124). CagA epitel hücre içine girdikten sonra onkojenik aktiviteye sahip sitoplazmik SHP-2 de dahil olmak üzere, pek çok molekülle

interaksiyona girer. *In vivo* çalışmalar, CagA ekspresyonuna sahip *Helicobacter pylori* zincirlerinin konak inflamatuvar yanıtında artışa ve bunun klinik sonucu olarak peptik ülser ya da gastrik kanser gelişiminde risk artışına neden olabileceğini göstermiştir. CagA ile infekte edilen transjenik farelerle yapılan bir çalışma ile gastrik kanser ve diğer neoplazmların gelişmesi sonucunda elde edilen verilere göre CagA'nın aşırı ekspresyonunun bir onkoprotein gibi davranabileceği iddia edilmiştir (125).

CagA aracılı karsinojenez gelişimi “vur-kaç mekanizması” denilen ve hem genomik hem de epigenetik değişimlerin etkili olduğu bir süreçtir. CagA pozitif *Helicobacter pylori*, infeksiyonu ile NF- $\kappa$ B'nin atipik aktivasyonu gastrik hücrelerde aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID)'nin ektopik ekspresyonunu indüklemektedir. NF- $\kappa$ B'nin uzun süreli aktivasyonu ise MutL homolog 1 (MHL1) gibi çok sayıda DNA yanlış eşleşme (mismatch, MMR) onarım genlerinin hipermetilasyonuna aracılık eden DNA metil transferazların düzeyini artırmakta ve genetik instabiliteye yol açabilmektedir. Gastrik karsinoma hücrelerinde CagA'nın indüklediği hipermetilasyon sonucunda p16, p14, E-cadherin, Run ilişkili transkripsiyon faktörü 3 (RUNX3) gibi tümör supresör genlerinde inbisyon meydana geldiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar gastrik karsinojenez oluşumunda önemli rol oynayan NF- $\kappa$ B'nin kronik *Helicobacter pylori* infeksiyonunda Ras, P12K-AKT ve tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR)-assosiyasyon faktör 6 (TRAF6) TRAF6- mitojen-aktif protein kinaz 7 (MAP3K7, TAK1) gibi pek çok yolla da aktive olduğunu göstermektedir. CagA'nın NF- $\kappa$ B'ye dışında, inflamasyonu tetikleyen diğer anahtar transkripsiyon faktörü olan sinyal iletilici ve transkripsiyon faktörü 3 aktive edici protein (STAT3) fosforilasyon mekanizmasından bağımsız olarak IL-6/gp130 sinyal yoluyla da aktive edildiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak, CagA pozitif *Helicobacter pylori* kronik infeksiyonu, NF- $\kappa$ B ve STAT3'ün aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinleri ve anti-apoptotik proteinlerin üretimini indükleyerek bir yandan kansere eğilimli hücrelerin artmasına yol açarken, diğer yandan apoptozu engelleyerek kanser gelişimi için predispozan etki yapmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, inflamatuvar yanıt ROS oluşumunu indükleyerek DNA hasarını artırmakta ve mutasyon birikimini hızlandırmaktadır (115, 126,127).

*Helicobacter pylori* neden olduğu gastrit ile konak hücre immün sisteminin bir seri inflamatuvar yanıtına neden olmaktadır. Bu yanıt, başlıca nötrofilik cevap yolunun

major kemokini olarak bilinen IL-8'in aşırı ekspresyonu ile ilgilidir ve IL-8'in aşırı ekspresyonu ise, CagAPAI'da lokalize olan T4SS aktivasyonuna bağımlıdır. *Helicobacter pylori*'nin gastrik epitelyal hücrelere adhezyonunun ardından T4SS, peptidoglikanların çözünür bileşenleri olan muramil dipeptitleri salgılar. Muramilpeptidazlar NF- $\kappa$ B'yi aktive eden intrasellüler bir proteinnükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain içeren protein 1 (Nod1)'e bağlanarak  $\beta$ -defensin 2, metalloproteinaz ve IL-8 gibi genlerinin ekspresyonuna neden olur ve sonuç olarak konak immün sistemi aktive olur. CagA'nın sitoplazmada aktif olarak dağılımı T4SS'in inflamatuvar etkisi ile birlikte genel olarak gastrik lezyonlar oluşumu ve adenokarsinoma ile bağlantılı olup, infeksiyonun daha ciddi olarak seyretmesine yol açmaktadır (128).

CagA pozitif *Helicobacter pylori* zincirleri, CagA negatif *Helicobacter pylori* zincirlerine göre daha yüksek seviyelerde IL-8 salınımına neden olmaktadır ve IL-8 sekresyonu kısmen CagPAI genlerine bağlıdır. Buna ek olarak cagPAI *Helicobacter pylori* zincirlerinin epitel hücrelere bağlanmasının, IL-8'in yanında Rho GTPazların, Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1/hücre bölünmesi kontrol protein 4 (Rac1/Cdc4)'nin aktivasyonu, EGFR gibi reseptörlerin aktivasyonu, c-met, c-Fos ve c-Jun gibi proto-onkoproteinlerin aktivasyonu gibi çeşitli hücresel yanıtları da indüklediği *in vitro* olarak gösterilmiştir (119).

Yapılan çalışmalar epitel hücreler içine adheze olan CagA'nın Src (bir protoonkogenik tirozin kinaz proteini)/ Abelson fare lösemi viral oncogen homolog 1 (Abl) kinazlar ile EPİYA kalıpları içindeki tirozin-fosforilasyonunun epitelyal hücre yapısını bozduğunu ve sinyal regüle kinaz (ERK)/mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağı gibi konak hücre sinyal yollarına SHP-2, Grb2, Crk/Crk-benzeri protein L (crk-L), C-Terminal Src kinaz (Csk), Met ve sıkı bağlantı proteini (ZO-1) ile interaksiyona girerek etki ettiğini göstermiştir.  $\beta$ -katenin, adhezyon bağlantılarının bir komponenti olup nükleusda T-hücre aktivatörü (Tcf)/lenfoid arttırıcı faktör (Lef)'in kofaktörü olarak etki etmektedir ve T4SS polarize epitelyal hücrelerin adhezyon bağlantılarını (AJs) bozarak,  $\beta$ -kateninin nükleer lokalizasyonuna yol açmaktadır.  $\beta$ -kateninin nükleer akümüasyonu ise siklin D1 ve c-myc gibi kanser bağlantılı genlerin ekspresyonunu indüklemektedir (129). Adenogastrik karsinoma hücrelerinde

tirozin fosforile cagA'nın özellikle SHP2'ye bağlandığı ve SHP2-Ras-ERK (MAP-kinaz) kaskadını stimüle ettiği düşünülmektedir (120).

Birçok çalışma CagA'nın NF- $\kappa$ B'yi doğrudan aktive ettiğini ve IL-8 salımını indüklediğini göstermiştir. İnflamasyon sürecinin erken döneminde *Helicobacter pylori* ile gastrik epitelyal hücreler arasındaki fiziksel temasla indüklenen NF- $\kappa$ B anahtar role sahiptir. İnsan gastrik epitelyal hücrelerinde NF- $\kappa$ B, IL-8 ve büyüme regüle protein (GRO- $\alpha$ ) gibi C-X-C kemokinlerin, CagA pozitif *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile nötrofilik yanıt gelişiminde kritik role sahip oldukları ve daha ciddi gastroduodenal hastalıklara neden oldukları düşünülmektedir. Aktive NF- $\kappa$ B epitelyal hücrelere antiapoptotik sinyallerin gönderilmesini sağlayarak gastrik neoplazi gelişimi aktive etmektedir (130,131).

Üç boyutlu (3D) yapısal analizleri CagA'nın N-terminal parçasının tümör süpresör olarak etki ettiğini ve RUNX3 ile interaksiyonun RUNX3'ün ubikinonizasyonunu ve degradasyonunu indükleyerek işlev kaybına yol açtığını göstermiştir. CagA N-terminal parçasının aynı zamanda tümör supresör protein p53-2 (TP53BP2) ile kompleks oluşturarak p53 aracılı apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir. N-terminal parçasının bu etkilerinin yanısıra C-terminal kuyruğu ise pro-onkojenik kaskadın disregülasyonuna yol açmaktadır. CagA'nın gastrik karsinogenezdeki etki mekanizması çoklu genomik ve epigenetik değişikliklere dayanmaktadır (115).

Son yıllarda yapılan çalışmalar CagA pozitif *Helicobacter pylori* zincirlerinin daha yüksek oranda nötrofilik ve mononükleer hücre infiltrasyonuna, çok daha ciddi atrofiye, intestinal metaplaziye, gastrik epitelyal hücre siklusunda değişimlere ve apoptozise neden olduğunu göstermiştir (132).

*Helicobacter pylori* infeksiyonu sonucu gelişen karsinogenezde, ROS üretimiyle oluşan başta DNA olmak üzere birçok makromoleküldeki hasarın daha etkin rol oynadığı iddia edilmektedir. *In vitro* çalışmalar, CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte epitel hücrelerde inflamasyon ve oksidatif stres biyogöstergelerinden olan olan hidrojen peroksit üretiminde ve TNF- $\alpha$  ve IL-8 düzeylerinde anlamlı artış olduğunu göstermiştir (111).

*Helicobacter pylori* infeksiyonunun neden olduğu oksidatif DNA hasarının belirlenmesinde 8-OHdG düzeylerinin en iyi biyogösterge olduğu düşünülmektedir. 8-OHdG, ROS ile indüklenen ve DNA baz mutasyonlarından sorumlu major DNA

modifikasyon ürünüdür. Frainati ve ark. (2003)'nın yaptıkları bir çalışmada, CagA pozitif olan *Helicobacter pylori* enfeksiyonlu hastalarda prekanseröz değişimlerin ve 8-OHdG düzeylerindeki artışın daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma yaşları 61±14 arasında değişen 65'i erkek ve 53'ü kadın olmak üzere 118 hastadan alınan özafago-gastroduodenal endoskopi örnekleri ile çalışılmıştır. Alınan 118 endoskopik örneklerden 74 hasta *Helicobacter pylori* pozitif olup bunların 40'ı CagA pozitif ve 34'ü CagA negatif olarak belirlenmiştir. Kalan 44 hasta ise, *Helicobacter pylori* negatif olup bunların 12'si *Helicobacter pylori* ile hiç infekte olmamışken 32'si ise daha önce *Helicobacter pylori* ile infekte olmuş ve enfeksiyon üçlü antibiotik ile tedavi edilmiştir. Alınan tüm endoskopik örneklerinden DNA ekstrasyonu ile elde edilen DNA örneklerinin amplikasyon ve jel elektroforezi metotları ile DNA hasarları tespit edilmiş ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)/kütle spektroskopisi (MS) ile de 8-OHdG miktarları ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda, gastrit ve intestinal metaplazi düzeylerinin *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda *Helicobacter pylori* negatif ve *Helicobacter pylori* eradike hastalara göre daha yüksek derecede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 8-OHdG düzeylerinin *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda *Helicobacter pylori* negatif hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Daha önce *Helicobacter pylori* enfeksiyonu geçirip tedavi olan hastalarda ise, *Helicobacter pylori* pozitif hastalardan daha düşük ancak *Helicobacter pylori* negatif hastalara göre daha yüksek 8-OHdG düzeyleri bulunmuştur. CagA etkisi açısından incelendiğinde CagA pozitif hasta örneklerinde hem gastrik hasar, hem de 8-OHdG'nin düzeylerinin önemli derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, CagA pozitif *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun sadece gastritik skor ve aktivite açısından değil, aynı zamanda atropi ve metaplazi açısından da çok daha ciddi hasarla bağlantılı olduğu görülmüştür. Prekanseröz lezyonların başlaması açısından kritik öneme sahip *incisura angularis* bölgesinde CagA pozitif *Helicobacter pylori*'nin daha ciddi atropik metaplaziye yol açtığı tespit edilmiştir. Oksidatif hasar açısından incelendiğinde *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda kontrol grubuna göre daha ciddi oksidatif hasarın meydana geldiği, oksidatif hasar düzeylerinin *Helicobacter pylori* pozitif ve *Helicobacter pylori* eradike hastaları arasında belirgin fark olmadığı, CagA pozitif hastalarda DNA hasarının CagA negatif hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, CagA'nın oksidatif stres ve

DNA hasarı oluşumunda etkin rol oynadığı görülmüştür. CagA'nın hücre içinde ROS akümülyasyonu yoluyla DNA'da nokta mutasyonlarına neden olarak, p53 ve diğer gen ekspresyonlarında bozulmaya ve sonuç olarak gastrik karsinogenez gelişimine neden olabileceği ifade edilmiştir (133). Papa ve ark.(2002)'nin CagA pozitif *Helicobacter pylori* infeksiyonunun yol açabileceği oksidatif DNA hasarını değerlendirdikleri ise, 60 hastadan alınan gastrik biopsi örneklerindeki 8-OHdG ve ROS oluşumu araştırılmıştır. Çalışmada 60 hastadan 40'nın *Helicobacter pylori* pozitif olduğu belirlenmiş ve ROS üretiminin bu hastalarda önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bu 40 hastadan 30'unda CagA pozitif olup bu hastaların 21'inde 8-OHdG düzeylerinin CagA negatif hastalara göre oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak ROS ve 8-OHdG oluşumları arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bu veriler doğrultusunda, *Helicobacter pylori* infeksiyonunda CagA pozitif suşlarında ciddi DNA hasarına neden olan ROS üretiminin çok daha yüksek olduğu; dolayısıyla CagA'nın serbest oksijen radikalleri aracılığı ile kronik gastritten gastrik karsinomaya giden süreçte güçlü bir etken olabileceği ileri sürülmüştür (132).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışma gastrik kanser gelişimde *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörlerinden CagA ve VacA'nın sinerjizm gösterdiğini tespit etmiştir (11, 134,135). Ladeira ve ark. (2008)'nin yaptıkları bir çalışmada 24 kontrol (*Helicobacter pylori* negatif), 42 *Helicobacter pylori* pozitif gastrit hastası ve 61 *Helicobacter pylori* pozitif gastrik kanser hasta olmak üzere 117 hastadan gastrik izolat toplanmış ve oksidatif DNA hasarı Comet yöntemi ile; *Helicobacter pylori* yoğunluğu PCR ile belirlenmiştir. CagA, VacA ve epitele temasla indüklenen virülans faktörü (IceA) virülans allel tiplendirmesi de yine PCR ile çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, CagA pozitif, VacAs1m1 ve IceA pozitif *Helicobacter pylori* pozitif bireylerde CagA negatif, VacAs2m2 ve IceA negatif genotipindeki *Helicobacter pylori* pozitif bireyler ve infekte olmamış bireylere göre çok daha yüksek oranlarda oksidatif DNA hasarının olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada örneklerin Comet yöntemi ile incelenmeleri sonucunda, CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde DNA tek zincir kırıklarının (SSB), labil alanların (SBSs), okside pürin ve primidin düzeylerinin CagA negatif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylere göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, CagA negatif *Helicobacter pylori*

ile infekte bireylerde ise, infekte olmamış bireylere göre DNA hasarlarının daha yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Aynı parametrelerin VagA s1m1 fenotipindeki *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerin, VagAs2m2 fenotipindeki *Helicobacter pylori* ile infekte bireylere ve IceA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerin de IceA negatif *Helicobacter pylori* infekte bireylere göre dikkat çekici oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Endoskopik örnekler *Helicobacter pylori* yoğunluğu açısından incelendiğinde gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Oksidatif DNA hasarında gastrik ortamdaki *Helicobacter pylori* yoğunluğundan ziyade *Helicobacter pylori* virülans faktörlerinin daha etkin rol oynadığı; özellikle CagA pozitif, VagAs1m1 ve IceA pozitif allellere sahip *Helicobacter pylori* suşlarının gastrik kanser gelişimde etkin rol oynadığı iddia edilmiştir (11).

### **Gama Glutamil Transferaz**

Gama glutamil transpeptidaz ( $\gamma$ -GGT), transpeptidaz reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Enzim glutatyon (GSH) metabolizmasında anahtar role sahiptir (136). Canlıların çoğunda bulunan  $\gamma$ -GGT enzimi *Helicobacter pylori* tarafından da sentezlenmektedir. Fare modelleriyle yapılan çalışmalarla  $\gamma$ -GGT'nin bakterinin gastrik kolonizasyonunda görev aldığı gösterilmiştir. Sekresyonun ve maturasyonun ardından  $\gamma$ -GGT enzimi aracılığıyla *Helicobacter pylori* konakçının membranına iyonik bağlarla bağlanmaktadır. Yapılan çalışmalar  $\gamma$ -GGT'nin *Helicobacter pylori* nedeniyle gelişen apoptozun indüksiyonunda da rol oynadığını göstermiştir (137-138). Ayrıca  $\gamma$ -GGT'nin, IL-8 üretimini ve NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunu indüklediğini ve bu yolla gastrik epitelyumdan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> salınımına ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına yol açtığını gösterilmiştir (111).

### **Adhezyon Faktörleri**

Gastrik mukus tabakası içinde bulunan *Helicobacter pylori* gastrik lümene yakın olabilir ya da gastrik glandlar içinde bulunabilir; serbestçe yüzebilir ya da gastrik epitele tutunabilir. *Helicobacter pylori*'nin adhezinlerle musine bağlanması gastrik mukoza epitelinde kolonize olmasını sağlar ve bu olay bazı virülans faktörlerince kodlanan çeşitli genlerin ekspresyonu ile tetiklenmektedir. Bakteriyi sıvı akışı,



peristaltik hareketler ya da mukus tabakasının dökülmesi gibi çeşitli mekanizmalardan korur (139).

Bakteri yüzeyinde tutunmuş durumda olan adhezinler gastrik mukozada eksprese edilen glikanların yapısını tanıyarak epitelyal yüzeye tutunmayı sağlayan hayati öneme sahip moleküllerdir. *Helicobacter pylori*'nin gastrik mukoza epiteline dış membran proteinleri (OMP) adı verilen adhezinlerle tutundukları bilinmektedir. *Helicobacter pylori* genomunun yaklaşık %4'ünün OMP'kodladığı tahmin edilmektedir ve OMP ekspresyonunun gastrointestinal hastalıklarla ve dolayısıyla gastrik kanser gelişimi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (81) .

OMP'ler *Helicobacter pylori*'nin ana adhezinleri olup bu gruptaki BabA, eritrositler ve gastrointestinal mukoza epitelyal hücrelerde bulunan ABO/Lewis b (LeB) antijenini tanıır. BabA *Helicobacter pylori* zincirlerinin yaklaşık %45-95'inde eksprese edilmektedir (140-142). BabA 78-kDa büyüklüğünde olup, BabA geni tarafından kodlanmaktadır (18). Normal gastrik dokuda BabA taşıyan zincirler daima gastrik musin (MUC-5AC) ve LeB-pozitif hücelere bağlanırlar. BabA-LeB etkileşimi *Helicobacter pylori*'nin epitelyal yüzeye bağlanmasının yanısıra T4SS sisteminin neden olduğu konak hücre sinyal sistemindeki değişimleri de indükleyerek, inflamasyonu artıran genlerin transkripsiyonunu, intestinal metaplazi gelişimini ve bunlarla bağlantılı prekanseröz dönüşümlerin meydana gelmesini indükler (19, 140-141). BabA adhezini bakterinin konak ortamına adaptasyon sürecinde çeşitli alt tiplere evrilmiş olup, bunlardan BabA2'nin duodenal ülser gelişimi ve gastrik kanser gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir epidemiyolojik çalışma ile Almanya, Türkiye ve Kuzey Portekiz'den elde edilen suşlarda BabA2 ekspresyonunun daha ciddi gastrointestinal hastalıklarla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (81).

Adhezyonda görev alan başka bir adhezyon faktörü de SabA'dır. Sialik Lewis X (sLex) ve Lewis a (sLea) antijenlerinin karbonhidrat yapısına bağlanır (81,140). *In vitro* çalışmalarda *Helicobacter pylori*'nin  $\beta$ 3 GlcNAc T5 gen kodlanmasının indüksiyonu yoluyla sialil-Lewis antijenlerinin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (81). Lewis antijenleri infekte ve inflamasyon görülen gastrik mukozada yaygın olup, Lewis b ekspresyonu *Helicobacter pylori*'nin yoğunluğuna bağlı olarak artış göstermektedir. İnsan Lewis b'sini eksprese edebilen transjenik farelerde gastrit ve gastrik kanser gelişimi meydana gelirken, yabancı tiplerde böyle bir etkinin

olmadığı gösterilmiştir. Lewis a ve Lewis x SabA aracılığı ile bağlanırken, Lewis b'nin BabA aracılığı ile bağlandığı bildirilmiştir. BabA'yı kodlayan BabA2 genine sahip zincirlerin artmış epitelyal proliferasyona ve inflamasyona ve dolayısıyla duodenal ülser, gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve gastrik adenokarsinoma riskinde artışına neden oldukları bildirilmiştir (85,142,143).

*Helicobacter pylori*'nin diğer önemli dış membran proteini 34kDa büyüklüğündeki OipA dir. Adhezyonda görev almasının yanısıra proinflamatuvar yanıtı indüklediği de bildirilmiştir. OipA'yı kodlayan gen tüm *Helicobacter pylori* zincirlerinde yer alır; ancak 5' bölgesindeki CT dinükleotidlerin değişen sayıdaki tekrarları sonucu meydana gelen varyasyonları aracılığıyla ekspresyonu modüle edilmektedir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, OipA'nın ekspresyonu ile IL-8 ekspresyonu arasında güçlü bir bağlantı olduğunu ve bu nedenle OipA'nın gastrik enflamasyonda etkin rol oynadığını göstermiştir (19). Yapılan *in vivo* çalışmalarda OipA'nın gastrik epitelyal hücrelerde IL-8 salımında artışa ve bu yolla nötrofil infiltrasyonuna neden olduğu; ancak atrofiye yol açmadığı gösterilmiştir (85). Sugimoto ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada ise, OipA mutant ve yabancıl tip *Helicobacter pylori* ile infekte edilen Mongol farelerinde interlökin 1 (IL-1), interlökin 17 (IL-17) ve TNF- $\alpha$  mukozal sitokinlerinin indüklendiği ve gastrik mukozada inflamasyonun meydana geldiği gösterilmiştir (144). OipA'nın inflamasyonun yanı sıra aynı zamanda gastrik kanser gelişiminde de etkili olduğu bilinmektedir. Gastrik kanserle bağlantılı bir matriks proteinaz olan matriks metalloproteinaz 1'in (MMP-1) upregülasyonunda, glikojen sentaz kinaz-3  $\beta$ 'nin inhibisyonunda ve  $\beta$ -katenin'in hücre çekirdeğine translokasyonunda rol oynayan OipA bu yolla gastrik kanser gelişimini tetiklemektedir (81).

Birer dış membran proteini olan AlpA ve AlpB de konakçı hücre ve doku adhezyonunda görev almaktadırlar. AlpA/B lokusları istisnasız tüm *Helicobacter pylori* zincirlerinde bulunup infeksiyon sırasında eksprese edilmektedirler ve AlpA/B mutant zincirlerde gastrik dokuya adhezyon meydana gelememektedir. Yapılan bir çalışmada, lamininin AlpA ve AlpB için konakçı reseptörü olarak etki ettiği ve konakçı sinyal iletimi ve sitokin üretiminde etkili olduğu, bu iki faktörün eksik olduğu *Helicobacter pylori* zincirlerinde izogenik yabancıl tip *Helicobacter pylori* zincirlerine göre daha ciddi inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir (135, 140, 145).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori*'nin duodenal ülser başlatıcı gen A (DupA) adı verilen bir virülans faktörüne daha sahip olduğu bildirilmiştir. Duodenal ülser gelişimine neden olduğu düşünülen DupA, *Helicobacter pylori*'nin plastisiteyi kodlayan genom bölgesinde yer alan DupA geni ile kodlanmaktadır ve yapılan *in vitro* çalışmalarda IL-8 indüksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (81). *Helicobacter pylori*'nin yüzeyinde lokalize olan üreaz ve alkilhidroperoksiredüktaz (AhpC) enzimleri dış membran proteini olmamalarına rağmen adhezyonda rol oynamaktadırlar. Bu enzimler membranın bir parçası olduklarından için stroma musinlerine afinite gösterirler. Loke ve ark. (2007)'nin yaptıkları *in vitro* çalışmada polisakkaritler ve musinin AhpC ve üreaz subünite A (UreA)'ya bağlanabildikleri bundan dolayı polisakkaritlerin bağlanma bölgeleriyle kompetasyona girerek bakteriye karşı anti-adhezif etki gösterdiği ve böylece kolonizasyonu engelleyebileceği gösterilmiştir (140,146,147).

### **2.3. *Helicobacter pylori*-Konakçı Etkileşimi**

#### **2.3.1. Gastrik Mukozal İmmünite**

*Helicobacter pylori* infeksiyonunda primer immün yanıtın kritik role sahip olduğu bilinmektedir. *Helicobacter pylori* ilişkili inflamasyonun temelini; gastrik epitelyal hücrelerin non-spesifik aktivasyonu, polimorf nükleer nötrofiller, antijen sunan hücreler (dendritik hücreler ve makrofajlar gibi), CD4+ T hücreleri (Th1 ve Th17) ile bağlantılı immün yanıt oluşturmaktadır (148). Ayrıca, bakterinin gastrik epitelyal yüzeye yakın ya da invaze halde olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle, antijenik materyalleri ve LPS tabakası ile, sıkı bağlantı yapılarının bozulmasına ve salgıladığı toksinleriyle spesifik immün yanıtta da neden olabileceği belirtilmektedir (149). *Helicobacter pylori* infeksiyonunun patogeneğinde *Helicobacter pylori* virülans faktörleri ile birlikte gastrik mukozal faktörler ve çevresel faktörler de etkin rol oynamaktadır (150).

Mide, düşük pH'sı, mukus tabakası ve peristaltik hareketlerinden dolayı infeksiyöz ajanların büyük çoğunluğu için uygun bir ortam değildir. Ancak, *Helicobacter pylori* salgıladığı üreaz, flagellaları ve diğer virülans faktörleri ile gastrik ortama adapte olabilme özelliğindedir. Bu nedenle, gastrik mukoza *Helicobacter pylori* ve benzeri patojenlerin kolonize olmalarına karşı primer immün yanıt

oluşturabilmektedir. Gastrik mukozadaki primer immün yanıt, doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve komponent kaskadı ile oluşturulmaktadır. Ayrıca, Toll-İbenzeri reseptörlerinin ve bakteri duvarında yer alan LPS tabakaya spesifik bir reseptör olan CD14 molekülünün de erken dönem immün yanıtın başlatılmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (131).

Primer immün cevap, doğrudan bakteriyel faktörlerle ve dolaylı olarak olarak IL-8 ve inflamatuvar kaskattaki diğer sitokinlerin indüksiyonu ile olmaktadır. *Helicobacter pylori*'nin ekstratları nötrofillerce salınan IL-11b/CD18'i upregüle eder ve bu şekilde bakterinin hücre içi adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) bağımlı nötrofillerin endotelyumuna ve dokuya invaze olmasını sağlar. Farelerle yapılan bir çalışmada, bakteriyel stimülasyonun neden olduğu nötrofil adhezyonunun mikrovasküler permeabilitede artışa, mast hücre degranülasyonuna ve platelet agregasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bakteride bu etkiden sorumlu olan *Helicobacter pylori*-nötrofil aktive edici protein (Hp-NAB) adı verilen 150 kDa büyüklüğünde bir protein tanımlanmıştır. Gastrik mukozadaki nötrofil yanıtı; konakçı-derive kemotaktik sitokinler, lökotrien B4 (LTB4) gibi bioaktif lipitler ve antijen spesifik immünoglobülin G (IgG)'nin indüksiyonu ile gerçekleşir. Takiben, gastrik mukozaya adhezyon komplement aktivasyonunun ürünleri aracılığı ile dolaylı olarak meydana gelir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, *Helicobacter pylori*'nin gastrik mukozaya adhezyonunun sitoskeletal aktinin reorganizasyonu, sitokin sekresyonunda artışa neden olan IL-8 gen ekspresyonunun indüksiyonu da dahil birçok hücre içi değişimlere neden olduğu gösterilmiştir. Epitelyal IL-8, bakteriyel stimülasyona ek olarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu takiben TNF- $\alpha$  ve IL-1'in up-regülasyonu ile de eksprese olmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu sitokinlerin kronik gastritte lokal olarak üretildiğini göstermiştir. *In vitro* çalışmalar hem LPS pozitif ve hem de LPS negatif yüzey komponentlerinin periferal monositlerden sitokin salımını indüklediğini göstermiştir. Akut infeksiyonda nötrofil infiltrasyonu ve epitelyal hasar genellikle VacA kaynaklı olup, bakteriyel ürünlerin mukozaya geçişini ve mukozal makrofajlardan sitokin salınımını sağlamaktadır. *Helicobacter pylori* inflamasyonunda primer immün yanıtta görevli olan önemli hücrelerden biri de NK hücreleridir ve bakterinin periferal kan lenfositleri ile etkileşimi sonucunda MHC bağımsız NK hücre aktivasyonunu ve interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) salımını indüklenmektedir.

NK aktivasyonu ve INF- $\gamma$  indüksiyonu ise, antijen bağımlı fagositlerin aktivasyonuna ve Th1stimülasyonuna yol açarak inflamatuvar yanıtı tetikler (151).

*Helicobacter pylori*'nin gastrik mukozadaki etkisine ek olarak, konakçı inflamatuvar yanıtı da gastrik hastalıkların gelişimine önemli etkilerde bulunmaktadır. İnflamasyon DNA hasarı, proliferasyon artışı ve sitokinlerden ve büyüme faktörlerden zengin bir çevre oluşturarak karsinojeneze yatkınlığı artırmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu nötrofil, lenfosit, plazma hücreleri ve makrofajların aktive olmalarına yol açan inflamatuvar yanıtı indüklemektedir. Örneğin; bir nötrofil ve lenfosit aktive edici kemotaktik sitokin olan IL-8'in gastrik epitelyal hücrelerce sekresyonu bakterinin kolonizasyonu ile artmakta; yine CagA pozitif zincirlerce enfeksiyon konakçıda çok daha ciddi inflamatuvar yanıtı yol açmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu sonrası TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  ve IL-1 gibi sitokinlerce indüklenen inflamatuvar COX ve COX-2 düzeylerinde artış meydana gelmektedir. TNF- $\alpha$  ve IL-10 polimorfizimi üzerine yapılan çalışmalarda, IL-1 $\beta$  polimorfizmi ile birlikte *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun gastrik kanser gelişimi riskini önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Aynı şekilde, IL-8 polimorfizmi olan bireylerde gastrik kanser gelişimi oranı çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (14).

*Helicobacter pylori* enfeksiyonunda Th-1 hücreleri selektif olarak artmaktadır. INF- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin Th-1 hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve bakterinin indüklediği apoptozu artırdığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun epitelyal hücrelerde Fas ekspresyonunu artırarak gastrik mukoza hasarı, T hücre infiltrasyonu ve Fas/Fas ligand interaksyonu yoluyla gastrik epitelyal hücrelerde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu sırasında gastrik epitelyal hücrelerde meydana gelen apoptozun bakterinin sitotoksinleri ile doğrudan olarak indüklenebileceği ya da konakçı immünitesi nedeniyle ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür (150).

*Helicobacter pylori*'nin hem humoral hem de primer immün yanıtı indüklediği ve IgA, IgM ve IgG izotiplerini içeren lokal ve sistemik antikor yanıtına yol açtığı gösterilmiştir. *Helicobacter pylori*, özellikle mukus tabakasına yerleşen non-invaziv bir bakteri olmasına rağmen, yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla mide lamina propiasına da invaze olabildiği, lamina propianın mikro damarlarındaki eritrositlere

tutunabildiği ve yine lamina propriadaki immün hücrelerle doğrudan temasa geçebildiği gösterilmiştir. Özellikle lamina propriadaki immün hücrelerle olan doğrudan temasının gastrit ve gastrik kanser gelişimine predispozan olduğu iddia edilmiştir. Lamina propiada yer alan makrofajlar ve monositler *Helicobacter pylori*-derive ürünlere ve bakteri ve mukozanın doğrudan teması sonucu epitelyal hücrelerden gelen sinyallere verilen primer yanıtıdır. Diğer patojenlere yanıtta olduğu gibi *Helicobacter pylori* infeksiyonunda da adaptif immüitenin aktivatörü olarak IL-12 salgılayarak ve Th-1'leri stimüle ederek IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin salınımını sağlarlar. Bakterinin NAP, IL-12 ve IL-23'ün nötrofil ve monositlerden salınımını uyararak Th-1'in polarizasyonunu sağladığı bildirilmiştir. Gastrik mukozada IL-12 üretimi ve dolayısıyla Th-1 stimülasyonunun CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte olma durumunda gastrik ülser gelişimi ile yakın bağlantılıdır. Nötrofiller gibi makrofajlar da IL-6, IL-1 ve TNF- $\alpha$  salınımı ile *Helicobacter pylori* infeksiyonunda etkin rol oynamaktadırlar ve özellikle IL-6 salınımı, Toll benzeri reseptör 4 (TLR-4), MAP kinaz ve NF- $\kappa$ B gibi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (81). Makrofajların aktivasyonu sonucu salınan IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  ve IL-1b gibi *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile meydana gelen immün reaksiyonlar ve bakteri ile gelişen gastrik patojenez yöneten mediatörler ile birlikte T-hücre infiltrasyonu ile salınan CD45RO+, CD69+, CD4+ T hücreleri bu süreçte etkin rol oynarlar (150,151).

Yapılan araştırmalar Th-1 cevabının özellikle *Helicobacter pylori*-dendritik hücre etkileşimi sonucunda indüklendiğini göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda dendritik hücrelerle kokültürü yapılan *Helicobacter pylori*'nin IL-12 üretimini ve olgunlaşmasını indüklediği tespit edilmiştir. Bu etkinin özellikle cagPAI adacıklarının varlığına kısmen de olsa bağlı olduğu düşünülmektedir. Bakterinin Th-1 yanıtı downregüle edebildiği ve böylece kendini koruyabildiği de önerilmiştir. *Helicobacter pylori*, aynı zamanda mononükleer hücrelerdeki Th-1 hücrelerinin polarizasyonunu azaltan COX-2'yi de aktive edebilmektedir (85).

Stromal ve myeloid hücrelerin *Helicobacter pylori*'ye karşı primer immün yanıtlarındaki temel amaç bakteri kolonizasyonunun engellenmesi olup, bu interlökin 8 prekürsörü (CXCL8) gibi kemokinlerin salgılanması ile dolaylı olarak ya da ROS ve nitrik oksit (NO) gibi antimikrobiyal efektörlerin salınımı ile doğrudan olabilmektedir.

CXC kemokin ailesinin bir üyesi olan ve myeloid ve epitelyal hücrelerce primer immün yanıtta üretilen CXCL8, inflamasyonun major mediatörleri olup nötrofil ve T hücrelerinin kemotaksisini sağlarlar. Buna ek olarak, vasküler EGF ekspresyonunu stimüle ederek potent bir anjiojenik faktör olarak etki gösterir. Ayrıca, hücre proliferasyonunu ve canlılığını artırır, epitelyal-mezenşimal dönüşüm (EMT)'yi potansiyelize eder ve tümör alanındaki immün hücrelerini aktive eder (148,152). *Helicobacter pylori* pozitif gastrik biopsi örnekleri ile yapılan çalışmalarda epitelyal hücrelerde ve makrofajlarda CXCL8'in artış gösterdiği bulunmuştur. CXCL8'deki artışın CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte olan örneklerde dikkat çektiği; gastrik kanserli *Helicobacter pylori* pozitif hastaların serum örneklerinde gastrik kanseri olmayan *Helicobacter pylori* pozitif hastalara göre çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Elde edilen verilere göre CXCL8' in gastrik kanser oluşumu, gelişime hızı ve yayılması açısından kritik role sahip olduğu iddia edilmiştir. Epitelyal hücrelerle etkileşime girerek CXCL8 üretimini stimüle eden *Helicobacter pylori* infeksiyonunda T4SS sistemi de kritik role sahiptir. Peptidoglikan ve DNA gibi çeşitli bakteriyel komponentler T4SS sistemi ile konakçı hücreye aktarılmasına ve immün yanıtın oluşturulmasının yanı sıra, CagA pozitif suşlarda CagA'nın fosforilasyonu yoluyla CXCL8'in üretimini stimüle ettiği belirlenmiştir. CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde CagA negatif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylere göre çok daha yüksek oranda CXCL8 üretiminin meydana geldiği gösterilmiştir (153).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla gastrik karsinogenez gelişiminde konak genetik faktörlerinin önemli bir faktör olduğu kabul edilmiştir. Konağın infeksiyöz ajana cevabı ile kronik infeksiyonun yoğunluğu ve gastrik kanser gelişimi arasında yakın bir bağlantı bulunmaktadır. Ailesel olarak görülen gastrik kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda bu ailelerdeki bireylerin çoğunluğunda *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile birlikte gastrik atropi gibi prekanseröz lezyonların bulunduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, IL-1 $\beta$  polimorfizmi ile gastrik kanser gelişimi arasında yakın ilişki bulunduğu gösterilmiştir. IL-1 $\beta$  bir Th1 sitokini olup proinflamatuvar moleküldür ve *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde artış gösterir. IL-1 $\beta$  gen kümesi IL-1 $\beta$  ve IL-1RN den oluşur ve IL-1 $\beta$  artışına ya da azalışına yol açan çok sayıda polimorfizim içerir. Çalışmada ayrıca interlökin 1 reseptör-antagonist (IL-1R), IL-10 ve TNF- $\alpha$  polimorfizimlerinin de etkili olduğu bildirilmiştir (154). İnsan

sitokinlerindeki gen polimorfizimi *Helicobacter pylori* ile temastan sonra hücrelerce üretilen sitokin düzeylerine etki etmektedir. IL-1 $\beta$  ve IL-1RN polimorfizimlerinin *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde IL-1 $\beta$ 'nın gastrik mukozadaki düzeylerinde artışa neden olarak inflamasyon seviyelerini artırdığı bilinmektedir. Polimorfizimler aynı zamanda gastrik atrofi, aklorhidri, intestinal metaplazi ve gastrik adenokarsinoma gelişimde risk artışına neden olmaktadır (85).

El-Omar ve ark. (2000)'nin yaptıkları bir çalışmada, *Helicobacter pylori* ile infekte IL-1 $\beta$  polimorfiziminin yüksek oranda eksprese olduğu bireylerde, IL-1 $\beta$  ekspresyonunun sınırlı olduğu bireylere göre hipoklorhidri, gastrik atrofi ve gastrik adenokarsinoma gelişiminin daha yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (155). *Helicobacter pylori* ile infekte Moğol fareler ile yapılan bir çalışmada ise, bakteri maruziyeti sonrası 6 ila 12. haftalarda IL-1 $\beta$  düzeylerinin arttığı ve buna gastrik asit sekresyonunda azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir. Buna karşılık IL-1RN verilmesiyle gastrik asit seviyeleri normal seviyelere dönmüş ve IL-1 $\beta$ 'nin inflame mukozada esas modülatör olduğu öne sürülmüştür. Önemli bir proinflamatuvar olan IL-1 $\beta$  asit sekresyonunun potent bir inhibitörüdür. Hem *Helicobacter pylori*, hem de polimorfizm kaynaklı upregülasyonu gastrik kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (155). IL-1 $\beta$ 'nin düzenlenmesindeki bozukluklar özellikle IL-1 $\beta$ -31 (T $\rightarrow$ C) ve IL-1 $\beta$ -511 (C $\rightarrow$ T) polimorfizmi gastrik kanser gelişimi ile yakından bağlantılıdır. Yapılan bir çalışmada intestinal metaplazili hastalarda IL-1 $\beta$ -511 (C $\rightarrow$ T) polimorfizimi tespit edilmiştir. Bu polimorfizimin aynı zamanda displazi prevalansı ile de orantılı olup, IL-1 $\beta$  T allellerinin premalign gastrik lezyonlarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Ancak bu polimorfizimler *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile tetiklenen intestinal tip gastrik kanserlerde görülmesine rağmen diffüz tip gastrik kanserlerde görülmemektedir. IL-1 $\beta$  polimorfizimi gastrik asit sekresyonunu baskılayan IL-1 $\beta$  üretimini artırmaktadır ve *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerdeki atrofi düzeyi ile yakın bağlantılıdır. Tüm bunlara ek olarak *Helicobacter pylori* infeksiyonu IL-1 $\beta$  sekresyon seviyelerinin artışına yol açmakta ve asit salımını azaltmaktadır. IL-1 $\beta$ -511 t/t polimorfizmi ve *Helicobacter pylori* infeksiyonunun kombinasyonunun gastrik kanser gelişiminde diğer kanserojen ajanlara göre çok daha etkili olduğu, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun inflamasyon ve gastrik hücreler



üzerindeki gastrik atrofi ve hipoklorhidri gibi etkileriyle gastrik kanser oluşumuna yol açan IL-1 $\beta$  ekspresyonunu tetiklediği ileri sürülmüştür (10)

### 2.3.2. *Helicobacter pylori* ve reaktif oksijen bileşikleri

İnflamasyonun en karakteristik özelliklerinden biri de konak savunması sırasında infekte dokunun büyük miktarlarda ROS üreten nötrofiller ve makrofajlarca istilasidir. Oksidatif stresin tümör oluşumunda etkin rol oynadığı ve ROS'un onkogenlerin ekspresyonunu artırdığı ve hücre proliferasyonunu stimüle ettiği bilinmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde ROS düzeylerinin yükseldiği ve oksidatif DNA hasarının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalarda da *Helicobacter pylori*'nin kendisinin de ROS sentezini indüklediği bildirilmiştir. Obst ve ark. (2000)'nin yaptıkları invitro bir çalışmada AGS ve HM02 olmak üzere 2 tür gastrik adenokarsinoma hücre serisi 24 saat boyunca *Helicobacter pylori* ile inkübe edilmiş ve ROS, DNA sentezi, apoptozis indüksiyonu ve DNA onarım mekanizmaları açısından incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda *Helicobacter pylori*'nin ROS sentezini indüklediği, GSH seviyelerinde azalmaya, DNA fragmentasyonunda ve DNA sentezinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (156). Yine yapılan epidemiyolojik araştırmalarda, *Helicobacter pylori* pozitif hastalar ile *Helicobacter pylori* negatif hastalardan elde edilen gastrik biopsi örnekleri kemiluminisans metoduyla incelenmiş ve ROS oluşumunun *Helicobacter pylori* pozitif bireylerde anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (132). *Helicobacter pylori* ile enfeksiyonun ardından oluşan ROS/RNS gastrik mukozada hasara yol açabilmektedir (117). Yine *Helicobacter pylori* nin kendi ürettiği O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve ·OH 'nin de gastrik epitelyal hasara neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar NO'nun *Helicobacter pylori* 'nin kendi ürettiği O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile reaksiyona girebildiğini ve bu reaksiyon sonucunda inflamatuvar hücrelerce sentezlenen nitrik oksit radikali (·NO)'nin antibakteriyel etkisinin inhibe olabildiği gösterilmiştir (12). *Helicobacter pylori*, nötrofilik infiltrasyonla aktif inflamasyonu indükleyebildiği gibi lenfosit, monosit ve plazma hücrelerinin infiltrasyonu ile de kronik inflamasyonu tetikleyebilmektedir. Nötrofil ve monositlerin aktivasyonu ile bu hücrelerin O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve ·OH üretiminde görülen artış *Helicobacter pylori* ile infekte gastrik mukozada oksidatif hasara yol açmaktadır (157,158).

Stromal ve myeloid hücrelerce patojenik bakterilere karşı üretilen indüklenbilir ROS oluşumunun temel amacı patojenlerin gelişiminin sınırlandırılmasıdır. Buna karşılık sürekli ROS üretiminin hücre sinyal sistemini bozduğu, DNA hasarına yol açtığı ve sonuç olarak karsinogenez gelişimine zemin hazırladığı da bilinmektedir. *Helicobacter pylori* infeksiyonunda NOX ve spermin oksidaz (SMOX) olmak üzere ROS oluşumuna yol açan 2 ana yolak tanımlanmıştır. *Helicobacter pylori* infeksiyonunda NOX1 ve NOX2, 2 temel NADPH oksidaz enzimleri olup NOX1 gastrointestinal sistemde yüksek oranda eksprese edilirken, NOX2 immün hücrelerde yüksek miktarlarda bulunmaktadır. SMOX ise epitelyal hücrelerde ve makrofajlarda eksprese edilir ve bir biojenik poliamin olan sperminin oksidasyonu aracılığı ile hidrojen peroksit sentezler (148,153,159). NOX1 normal dokularda yüksek miktarda eksprese edilmemesine rağmen, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin bu enzimi indüklediğini göstermektedir. NOX1'i kodlayan genlerin ve bunların bir ürünü olan NOXO1 proteininin intestinal ya da diffüz tip gastrik kanserli *Helicobacter pylori* pozitif dokularda upregüle edildiği ve normal gastrik dokularda bulunmadığı gösterilmiştir (148,159). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, sperminin SMOX enzimi ile oksidasyonunun CagA indüksiyonlu apoptoz ve DNA hasarında kritik role sahip olduğunu göstermiştir. *Helicobacter pylori* ile infekte gerbil ve farelerde DNA hasarının CagA kaynaklı olduğu ve sadece SMOX eksprese eden epitelyal hücrelerde meydana geldiği belirlenmiştir. Öte yandan siRNA aracılı SMOX'nun inhibisyonu epitelyal hücrelerde CagA ile indüklenen apoptozu ve DNA hasarını engellediği de gösterilmiştir (121).

*Helicobacter pylori*'nin neden olduğu uzun süreli kronik inflamasyonun gastrik mukozada yüksek oranda çoğalma kapasitesine sahip gastrik bez kök hücrelerinde mutajenik ve karsinojenik gen modifikasyonlarına neden olabildiği gösterilmiş ve bakterinin neden olduğu oksidatif stresin gastrik kanser gelişimine neden olan major faktörlerden biri olduğu iddia edilmiştir (158-160).

### 2.3.3. *Helicobacter pylori* -DNA Hasarları

#### ***Helicobacter pylori*'nin Konakçı Genomunda Neden Olduğu Genetik Değişiklikler**

Gastrik karsinogenez, major etyopatogenik faktörü *Helicobacter pylori* olan kronik inflamasyonun indüklediği çok faktörlü, çok basamaklı bir süreçtir ve bu süreçte oksidatif DNA hasarı etkin rol oynamaktadır. *Helicobacter pylori*'nin tetiklediği mekanizmalar sonucunda meydana gelen hücre hasarı sitotoksinlerin, lipaz ya da fosfolipazların ya da üreaz aracılı toksik amonyak salınımı ile olabileceği gibi, aynı zamanda PML'lerce salınan serbest radikaller aracılığı ile de olabilmektedir. Serbest radikallerin oluşumu kronik gastrit ve gastrik kanser gelişimdeki süreçte en önemli basamaktan birini oluşturmaktadır (133).

Serbest radikaller ya da reaktif oksijen türleri (ROS) düşük molekül ağırlığına sahip olan; nükleik asitler de dahil olmak üzere birçok biyolojik molekülde hasara yol açan reaktif moleküllerdir ve karsinogenez gelişiminde etkin rol oynamaktadırlar (161). ROS, DNA oksidasyonu yolu ile, baz oksidasyonuna, abazik alanların meydana gelmesine, deoksiriboz şekerlerin oksidasyonuna ve SSB veya DSB oluşmasına ve tüm bunlara ek olarak tümör süpresör gen ekspresyonunda azalma ve protoonkogen ekspresyonunda artışa neden olarak kanser gelişimine zemin hazırlamaktadır (162). Nükleer ve mitokondrial DNA'da serbest radikallerin oluşturduğu, sonrasında SSB ve DSB'ye neden olan, en yaygın oksidatif hasar deoksiguanozinin okside formu olan 8-OHdG'dir ve oksidatif stres ve karsinogenezde yaygın olarak kullanılan bir biyogöstergedir (158, 163).

Deoksiguanozinin oksidasyonu karsinogenez gelişimine mutasyonların indüksiyonu ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ile meydana gelmektedir. 8-OHdG oluşumu karsinogenezi tetikleyen G→T transversiyonuna neden olabilmektedir. Yapılan pek çok çalışma kronik *Helicobacter pylori* infeksiyonunun 8-OHdG'nin oluşumuna yol açtığını göstermiştir. Farinati ve arkadaşları tarafından 27 kronik non-atropik gastritli, 41 atropik gastritli, 6 gastrik kanserli *Helicobacter pylori* ile infekte hasta ve 14 tanede kontrol olmak üzere 88 hasta örneği ile yapılan çalışmada 8-OHdG düzeyleri HPLC ile ve TBARS konsantrasyonları ise fluorimetrik yöntemle ölçülmüştür. 8OHdG konsantrasyonlarının kronik atropik gastritli hastalarda anlamlı

derecede yüksek olduğu ve *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile ciddi derecede korelasyon gösterdiği, aynı şekilde TBARS konsantrasyonlarının da atropik gastritli hastalarda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonununda kronik gastritin mutajenik ve karsinojenik potansiyele sahip oksidatif DNA hasarına sahip olduğu ve *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA adduct oluşumunda major etken olduğu iddia edilmiştir (133). Arabiski ve ark. (2005)'nin yaptıkları bir çalışmada 22 adet *Helicobacter pylori* infekte hastadan alınan gastrik biopsi örneği Comet yöntemi ile incelemiş ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek DNA kırıkları oluşumunun gerçekleştiği belirlenmiştir (164). Nishibayashi ve ark. (2003)'nin yaptıkları başka bir çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif hastaların gastrik mukoza örnekleri ile *Helicobacter pylori* negatif hastaların gastrik mukoza örnekleri karşılaştırılmış yine 8-OHdG seviyelerinin *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (165). Ma ve ark. (2004)'nin immünohistokimyasal metot kullanarak yaptıkları bir çalışmada ise, *Helicobacter pylori*'nin 8-nitroguanin oluşumunu indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca, *Helicobacter pylori* ile infekte gastrik bez hücrelerinde gastrik kanser için bir prognostik faktör olan proliferatif hücre nükleer antijen (PCNA) akümülyasyonunun meydana geldiği, 8-nitroguanin ve 8-okzodG nin düzeylerinde önemli artış olduğu gösterilmiştir (166) .

Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar gastrik karsinogenin *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu mukozal hasar ve yüksek ROS üretimi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. VagA, CagA gibi bakteriyel toksinler ve nötrofil infiltrasyonu mukozal hasarı ve ROS/NOS üretimi genetik instabiliteye neden olabilmektedir. *Helicobacter pylori* infeksiyonu gastrik inflamasyon ve karsinogenin sürecinde SSB ve DSB'lere neden olabilmektedir (167). DNA hasarları içinde en tehlikelisinin DSB'ler olduğu bildirilmiştir. DSB'lerin biyolojik açıdan önemi diğer DNA hasarlarına oranla onarımlarının çok daha karmaşık ve güç olmasından kaynaklanmaktadır. Kırılan DNA parçalarının yeniden yapışmasında oluşan hatalar sonucu kromozom materyalinde kayıp, kromozom parçalarının eşleşmesinde hata vb. mutasyonlar meydana gelebilmekte ve özellikle tümör supresör genlerde ya da protoonkogenlerde oluşan bu tür mutasyonlar tümör gelişimine yol açabilmektedir (168). Endojen veya ekzojen kaynaklı olarak meydana gelen DSB, onarılmadığında hücre ölümüne ya da genomik instabiliteye yol açabilir. Somatik hücrelerde meydana gelen DSB, kanser oluşumuna

neden olurken; reproduktif hücrelerde kalıcı mutasyonlara veya kromozomal anomalilere yol açmakta, gelişim sürecinde ise gelişimsel anomalilere neden olmaktadır (169).

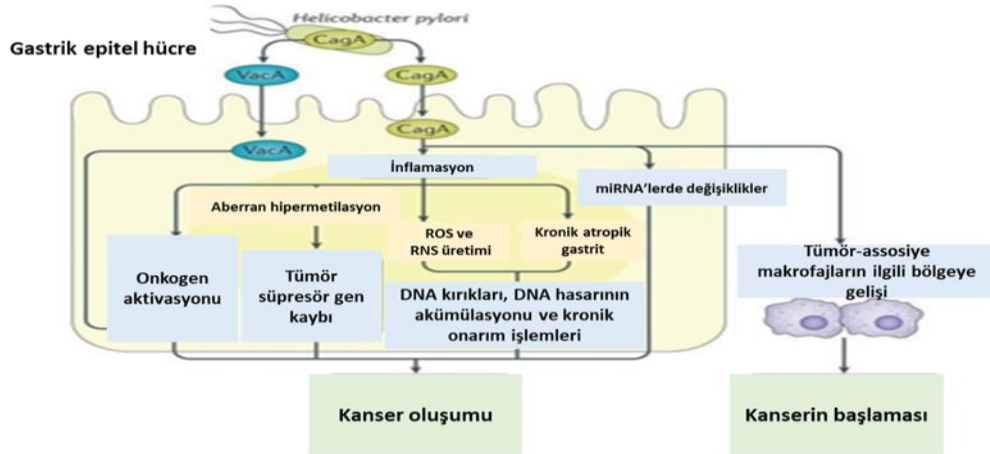
*Helicobacter pylori* konakçı genomunda DNA kırıkları oluşturabilmektedir. ROS varlığında ya da yokluğunda DSB'lerin bir sonucu olarak infekte gastrik mukoza hücrelerinde H2AX'in fosforilasyonu gerçekleşebilmekte ve  $\gamma$ H2AX meydana gelebilmektedir. *Helicobacter pylori* kronik infeksiyonunun DSB'ye yol açtığına dair literatürse az sayıda çalışma vardır (13). Sentani ve ark. (2008)'nin yaptıkları bir çalışmada gastrik malignite derecesi ile  $\gamma$ H2AX ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğu,  $\gamma$ H2AX ekspresyonunun gastrik kanserli mukozal epitelial hücrelerde nonneoplastik gastrik mukozal epitelial hücrelere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (170). Xie ve ark. (2014)'nin yaptıkları bir çalışmada 320 kronik gastritli, intestinal metaplazili ve gastrik karsinogenizli hastadan alınan gastroduodenal biopsi örnekleri immünohistokimyasal ve Western blot teknikleri ile çalışılmış,  $\gamma$ H2AX'in epitelial hücre çekirdeklerinde akümüle olduğu ve gastrik karsinoma hücrelerinde tümör lokalizasyonu, farklılanması ve lenfoid bez metastazı gibi çeşitli patolojik özellikleri ile korole olarak ekspresyonun arttığı gösterilmiştir (171). Yabuki ve ark. (1997)'nin 35 *Helicobacter pylori* ile infekte total ya da kısmi gastroektomi yapılmış, intestinal adenokarsinomalı hasta örnekleriyle SSB ve DSB'lerin belirlenmesi amacı ile yaptıkları bir çalışmada geri dönüşsüz DNA fragmantasyonu, SSB ve DSB'ler birlikte apoptoza giden hücreler tespit edilmiş ve *Helicobacter pylori* infeksiyonunda intraepitelial nötrofil infiltrasyonunun mukozal hasara ve karsinogeneze anlamlı derecede etkisi olduğu ileri sürülmüştür (167).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda *Helicobacter pylori* virülans faktörlerinin de DNA hasarında etkin rol oynadığını göstermiştir. Özellikle CagPAI ile kodlanan T4SS sisteminin DNA hasarına yol açtığı düşünülmektedir. Hartung ve ark. (2015)'nin yaptıkları bir çalışmada T4SS in inflamasyon ve karsinogenez gelişiminde etkin rol oynayan NF- $\kappa$ B aktivasyonunu ve IL-8 salımını ve buna paralel olarak da DSB'lerin oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (172). Koepfel ve arkadaşlarının *Helicobacter pylori*'nin indüklediği DNA hasarı ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, insan adenokarsinoma hücreleri (AGS) ve insan gastrik tubuler adenokarsinoma hücrelerinde (MKN74) *Helicobacter pylori* ile infeksiyonu

sonucunda oluşan  $\gamma$ H2AX ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. İnkübasyondan 6 saat sonra DNA DSB akümülyasyon düzeylerinin ionize radyasyon ile 18 saat boyunca maruziyet sonucunda ulaşılan DNA DSB akümülyasyon düzeyleri ile benzer seviyede olduğu gözlenmiştir. Çalışmada Comet yöntemi ile AGS ve MKN74 hücreleri arasındaki DNA hasarı karşılaştırılmış ve AGS hücrelerinde inkübasyonun 6. saatinde DNA hasarı dikkat çekici düzeylere ulaşırken MKN74 hücrelerinde bu düzeye 18. saatte ulaşılmıştır. Çalışmada aynı zamanda *Helicobacter pylori*'nin hücre siklusu üzerine olan etkisi de araştırılmış ve *Helicobacter pylori*'nin G1/S fazını durdurduğu tespit edilmiştir (173). Hanada ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmalarda *Helicobacter pylori* pozitif gastrik biopsi örneklerini incelemişler; bakterinin  $\gamma$ -H2AX akümülyasyonu ile birlikte DSB oluşumunu ve ataksi telenjiektazi mutant (ATM) protein aktivasyonuna yol açtığını gözlemlemişlerdir. Çalışmalarda CagA pozitif ve CagA negatif *Helicobacter pylori* ile infekte gruplar da karşılaştırılmış ve her iki grupta da kromozom instabilitesinin meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerin CagA negatif *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerden 2 kat fazla gastrik kanser gelişme riskine sahip oldukları gösterilmiştir (12,174). *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA hasarı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada ise *Helicobacter pylori* infeksiyonunun konak hücrelerin genomik disintegrasyonuna ve DSB oluşumuna yol açtığı tespit edilmiştir. Primer ve transforme fare ve insan epitelyal ve mezenşimal hücrelerle yapılan bu araştırmada, AGS hücrelerinde 6 saatlik inkübasyonun ardından DNA fragmentasyonunun ve DSB oluşumunun doz ve süre bağımlı olarak arttığı ve GSH tüketiminde artış olduğu gösterilmiştir (13).

DNA oksidasyonunun başta baz oksidasyonu olmak üzere pek çok tipte DNA hasarına yol açtığı bilinmektedir. Baz eksizyon onarım mekanizması başta 8-oxodG olmak üzere okside bazların temel onarım mekanizmasıdır. Çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin indüklediği kronik inflamasyonun baz eksizyon onarım mekanizması eksikliğine neden olan ROS/RNS ve sitokinlerde dikkat çekici artışa neden olabildiğini göstermiştir (158). Kidane ve ark. (2014)'nın yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* infeksiyonunun oksidatif ve küçük baz hasarlarını indüklediği ve sonrasında da abazik alanların artışına neden olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmada insan normal gastrik epitelyal hücreleri (GES-1) *Helicobacter pylori* ile 12 saat

boyunca inkübe edilmiş, inkübasyonun sonunda hücre siklusunun tüm fazlarında özellikle G1 fazında  $\gamma$ -H2AX pozitif hücrelerinin yayıldığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, infeksiyon sırasında genomik DNA'da yüksek oranda apürinik/apirimidik (AP) alanlarının oluştuğu ve yine genomik instabiliteye neden olan 8-okzoguanin DNA glikosilazın (8-OGG1) yüksek derecede eksprese olduğu tespit edilmiştir (175).



Şekil 2.7. Helicobacter pylori'nin konakçı genomundaki genetik ve epigenetik mekanizmaları (176).

### ***Helicobacter pylori* 'nin Konakçı Genomunda Neden Olduğu Epigenetik Değişiklikler**

Epigenetik değişiklikler, DNA sekansını etkilemeyen ancak gen ekspresyonunu ve kromozom yapısını etkileyen değişikliklerdir. Başlıca epigenetik değişiklikler, histon modifikasyonları ve DNA metilasyon ile oluşan değişikliklerdir (177) (Şekil 2.7).

DNA metilasyonu insan genomundaki en yaygın epigenetik değişimlerden biridir. DNA metilasyonu başlıca nükleotitleri etkiler; çoğunlukla CpG dinükleotitlerinin oluşmasına yol açan sitozinin ve takibinde guanozinin metilasyonu ile meydana gelmektedir. Gastrik kanserlerde promoter gen metilasyonu kanser gelişimini tetikleyen en önemli faktör olup, onkogenlerin ve kanser ile ilişkili genlerin

hipometilasyonu tümörögenез, progresyon ve metastaz ile bağlantılıdır. Diğer taraftan, CpG adacıklarının hipermetilasyonu tümör suppresor genlerde, pro-apoptotik genlerde ve DNA onarım genlerde baskılanmaya yol açmaktadır (178).

Pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonucunda *Helicobacter pylori* infeksiyonun doğrudan ya da epigenetik yollarla genetik instabiliteye neden olduğunu göstermiştir. *Helicobacter pylori* infeksiyonu DNA metilasyonu, miRNA bağımlı post transkripsiyonel baskılanma ve histon modifikasyonu gibi pek çok epigenetik değişimlere yol açabilmektedir (12) .

Yapılan çalışmalarda aberan metilasyon kalıbının *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Maekita ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada non-kanseröz gastrik mukozada *Helicobacter pylori* infeksiyonun DNA metilasyonu üzerindeki etkisini kantitatif olarak ölçmüşler ve gastrik kanser gelişme riskini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonunda bakteri infeksiyonunun non-kanseröz mukozada çoklu CpG alanlarında metilasyonu indüklediği ve gastrik kanser gelişiminde risk faktörü olabileceği rapor edilmiştir (179,180). Kang ve ark. (2003)'nın yaptıkları bir çalışmada ise, gastrik kanserli ve kronik gastritli hastalardan alınan 27 gastrik biopsi örneği incelendiğinde gastrik kanserli hastalarda belirlenen metillenmiş genlerin miktarının kronik gastritli hastaların örneklerine göre çok daha yüksek olduğu, RUNX3 ekspresyonunun promotor metilasyonu ile yakın bağlantılı olduğu gösterilmiştir (181).

Histon proteinleri, hücre çekirdeğinde dinamik kromatin yapısının düzenlenmesine ve devamına katkıda bulunan, genlerin aktivasyonunu ya da inhibisyonunu etkileyen, DNA onarım mekanizması ve diğer birçok prosesinde görev alan proteinlerdir. Kovalan histon modifikasyonlarından en önemlisi lizin residülerinin asetilasyonu olup, histonasetil transferaz (HAT) enzimleri ile düzenlenmektedir. HAT'lar lizin yüklerinin nötralizasyonu ile ve dolayısıyla transkripsiyonun ardaşık aktivasyonu ile oluşan DNA ve histon arasındaki etkileşimin zayıflamasına yol açar. Histondeasetilaz (HDAC) enzimleri ise, bunun tam tersi lizin rezidülerinin deasetillenmesini, kromatinin baskın duruma gelerek tümör supresör genlerin baskılanmasına ve sonuç olarak kanser gelişimine neden olabilirler (182). Histon modifikasyonları gastrik kanser gelişimde aktif rol oynamakta olup, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun histon modifikasyonları üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan bir *in*



*vitro* çalışmada gastrik epitelyal hücre serisi ve primer gastrik hücrelerde *Helicobacter pylori*'nin p21<sup>WAF1</sup> ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (180). *Helicobacter pylori*'nin histon modifikasyonu etkisi ile ilgili yapılan diğer bir *in vitro* çalışmada ise, *Helicobacter pylori*'nin cagPAI bağlı olarak H3'ün deasetilasyonuna ve defosforilasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (182)

*Helicobacter pylori*'nin indüklediği karsinogenezde tümör supresor genlerinde meydana gelen metilasyon ve asetilasyon kalıplarındaki değişimler büyük önem taşımaktadır. Araştırmalar COX-2, E-cadherin, p16 ve RUNX3 gibi pek çok genin bulunduğu CpG adacıklarındaki metilasyonunun gastrik kansere neden olduğunu göstermiştir (181,183). Katayama ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada, MKN45 insan gastrik hücre serisi *Helicobacter pylori* ile infekte edildikten sonra infeksiyonun RUNX3 geninde metilasyona ve sonrasında da ekspresyon kaybına yol açtığı gösterilmiştir (184). *Helicobacter pylori*'nin DNA metilasyonuna üzerine etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, ise E-cadherin ekspresyonu yapan CDH1 geninde de metilasyon meydana geldiği ve bu metilasyon derecesinin kontrol grubuna göre *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde çok daha yüksek olduğu bulunmuştur (185). Huang ve ark. (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada ise, *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile indüklenen IL-1 $\beta$  aktivasyonunun E-cadherin'in promotor bölgesinin metilasyonunda etkin rol oynayabileceği gösterilmiştir (186).

*Helicobacter pylori* ile oluşan inflamatuvar yanıt, oksidatif DNA hasarı ve hücre siklusunda değişikliklerin yanı sıra DNA onarım mekanizmasını da etkilemekte ve DNA onarım proteinlerinde yol açtığı mutasyonlar kanserojeniz gelişimine neden olmaktadır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA hasarı onarım mekanizmasında epigenetik değişimlere de neden olduğunu göstermiştir (187,188).

DNA hasarının onarımında baz eksizyon onarımı (BER), nükleotit eksizyon onarımı (NER), MMR ve çift zincir kırıkları onarımı (DSBR) olmak üzere 4 ana onarım mekanizmasının olduğu bilinmektedir (189). *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA onarım mekanizmalarının etkilerini azalttığı ve gastrik karsinogenez oluşumuna neden olan mutasyon ve genomik instabilitelere yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (180,190-192).

Daha önde de belirtildiği üzere, *Helicobacter pylori* 8-okzodG, SSB ve DSB'ye dönüşebilen AP alanlar ve DNA çapraz bağları da dahil birçok farklı tip DNA hasarına yol açabilmekte ve bu tip değişimler başta BER olmak üzere birçok onarım mekanizması ile düzeltilebilmektedir. Meira ve ark. (2008)'nin BER defekti olan hücrelerle yaptıkları bir çalışmada, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun inflamatuvar yanıtın artırmasının bir sonucu olarak ROS ve tümör promotör sitokinlerde artış meydana getirdiğini göstermişlerdir (193). Yine yapılan çalışmalar *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA'da AP alanların akümülyasyonuna neden olduğunu; bunun da genomik instabilite ve hücrel transformasyonla sonuçlanan DNA DSB'na yol açtığı gösterilmiştir (175,180). Yapılan çalışmalar, *Helicobacter pylori* infeksiyonu ile indüklenen ROS'un epitelial hücre hatlarında ve mukozal biopsi örneklerinde AP endonükleaz 1 (APE1) protein ve mRNA düzeylerini arttırdığı, infekte hücrelerin DNA onarım genlerinde de oksidatif hasara neden olduğunu göstermiştir. Futagami ve ark. (2008)'nin *Helicobacter pylori* ile infekte gastrik biopsi örnekleriyle infekte olmayan gastrik biopsi örneklerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, APE-1 ekspresyonunun infekte dokularda çok daha yüksek olduğu bulunmuş ve APE-1 in *Helicobacter pylori* pozitif inflamatuvar ve neoplastik gastrik hastalıklarında etkin rol oynadığı iddia edilmiştir (194)

Yanlış eşleşme onarımı, DNA onarım mekanizmalarının en önemlilerinden biri olup, doğru işlememesi veya az çalışması genomik stabiliteye yol açabilmektedir. *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA yanlış eşleşme proteinleri 1,2 ve 6 (MLH1, MSH2, MSH6) ve PMS protein homolog 1 ve 2 (PMS1 VE PMS2) gibi MMR'de rol alan çeşitli efektör proteinlerin ekspresyonlarını downregüle ettiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Yine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla MLH1'in metilasyonunun CpG'nin promotör bölgesinde artış gösterdiği, gastrik karsinomunun progressiyonunda etkili olduğu ve bu metilasyonun dirençli *Helicobacter pylori* infeksiyonuna kısmen bağlı olduğu gösterilmiştir (180,195) .

DNA'da oluşan DSB'lerin başlıca non-homolog uç bağlama (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HR)'den oluşan iki mekanizmayla onarılmaktadır. NHEJ, Ku70/80 ile başlatılırken, HR mekanizması ATM ve serin/treonin-protein kinaz (ATR) yolları ile başlatılmaktadır ve bundan dolayı ATM/ATR ve Ku70/80 proteinleri DNA onarım mekanizmasında önemli role sahiptir. Hanada ve ark. (2014)'nin

yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda ATM proteininin aktive olduğu,  $\gamma$ -H2AX düzeylerinin arttığı ve *Helicobacter pylori* 'nin indüklediği DSB'lerin özellikle ATM bağımlı yanıtta kromozom aberasyonlarının azaltılmasında ya da artırılmasında etkili olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda *Helicobacter pylori* ile enfekte dokularda, ATM, ATR, Ku proteinlerinin indüklendiği; hücre siklusunda değişiklikler görüldüğü ve p53 aktivasyonunun gözlemlendiği belirtilmiştir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda virülans faktörlerinin DSB gelişiminde de önemli etkiye sahip olduğu, CagA pozitif *Helicobacter pylori* örneklerde CagA negatif *Helicobacter pylori* ile enfekte örneklerle göre çok daha yoğun DSB'lerin meydana geldiği; ayrıca CagA'nın RAD51'i inaktive ettiği bildirilmiştir (196). Bae ve ark. (2013)'nin Moğol fareleriyle yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* ile indüklenen oksidatif stresin NEHJ ve HR tamir yollarını uyardığı, hücre siklusu arrestine ve apoptoza aracılık ettiği belirlenmiştir (197).

Son yıllarda yapılan epigenetik çalışmalar *Helicobacter pylori* 'nin BER, MMR ve DSBR ile ilişkili onarım proteinlerinin ekspresyonlarını modüle ettiği ve malign hücre transformasyonuna dönüşümüne yol açtığını göstermektedir. Ancak, bu konuda daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu da düşünülmektedir (180).

#### 2.4. İnflamasyon-Kanser İlişkisi

İnfeksiyon nedenli kanser gelişimi mekanizması ile ilgili çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlardan ilki, enfeksiyöz ajanın konak hücre ya da dokuları üzerindeki doğrudan etkisi yoluylaadır. Bu olay Viral DNA'nın konakçı DNA'sına integrasyonu ile konakçı DNA'sında meydana gelen insersiyon, delesyon, translokasyon ve amplifikasyon sonucu oluşan konakçı DNA'sındaki değişimlerle gelişen karsinogenez şeklinde gelişir (hepatit B virüsünün X-proteini ya da human papilloma virüsünün E6 ve E7 proteinleri gibi). Diğer bir mekanizma; immüsupresyon yoluyla karsinogenez gelişimidir (kapoksi sarkomanın neden olduğu immüsupresyon sonucu çeşitli kanser tipleri). Başka bir mekanizma ise; inflamatuvar hücrelerinin oluşturduğu ROS ve RNS'nin konak DNA'sında hasara yol açması sonucunda gelişen karsinogenezdir (198).

İnflamasyon endojen ve ekzojen etkenlerin neden olduğu enfeksiyon ya da hasarı takiben gelişen primer ve sekonder immün sistemin koordineli bir yanıtı sonucu

oluşur. Doku homeostazındaki herhangi bir bozulma sonucu savunma mekanizmasının ilk basamağı olan primer immün sistem hücreleri aktive olur. Başlıca primer immün sistem hücreleri makrofajlar, mast hücreleri, dendritik hücreler ve natural killer hücreleri olup inflamatuvar cevabı başlatan sitokinler, kemokinler, matrix remodelling proteazlar, reaktif oksijen ve nitrojen türleri salgırlar. (199). İnfeksiyon ve inflamasyon çeşitli oksidant oluşturan enzimleri indüklerler ve aktive ederler. Bu enzimlerin başlıcaları NADPH oksidaz süperoksid dismutaz, ksantin oksidaz ve myeloperoksidazdır (198).

**NADPH Oksidaz:** Bir membran enzimi olup oksijen ve NADPH dan süperoksid ( $O_2^-$ ) oluşumunu katalizler. Aynı şekilde ksantin oksidaz da süperoksid anyonunu ( $O_2^-$ ) oluşturmaktadır.

**Süperoksid Dismutaz:** Süperoksidin hidrojen perokside ( $H_2O_2$ ) dönüşümünü katalizler. Eukaryotik canlılarda iki tip süperoksid dismutaz enzimi vardır; sitoplazmada bulunan bakır içeren süperoksid dismutaz ve mitokondride yer alan ve mangan içeren süperoksid dismutaz. Mangan içeren süperoksid dismutaz tümör nekroz faktörün aşırı salgılanması ya da oksijenli solunumun aşırı artması gibi çeşitli stres durumlarında indüklenirken, bakır içeren süperoksid dismutaz bu gibi şartlardan etkilenmemektedir.

**Nitrikoksit Sentetaz (NOS):** Arginin, oksijen ve NADPH'dan nitrik oksit (NO) sentezini katalizler. NO sentezinin konstitütif ve indüklenbilir (iNOS) olmak üzere iki tipi vardır. Konstitütif formu düşük aktiviteye sahip olup endotel sisteminde ve sinir sisteminde sinyal molekülü olarak görev alırken, indüklenbilir formu sitokinler ya da lipopolisakkaridler tarafından uyarılan fagositler tarafından salgılanırlar ve yüksek aktiviteye sahiptirler.

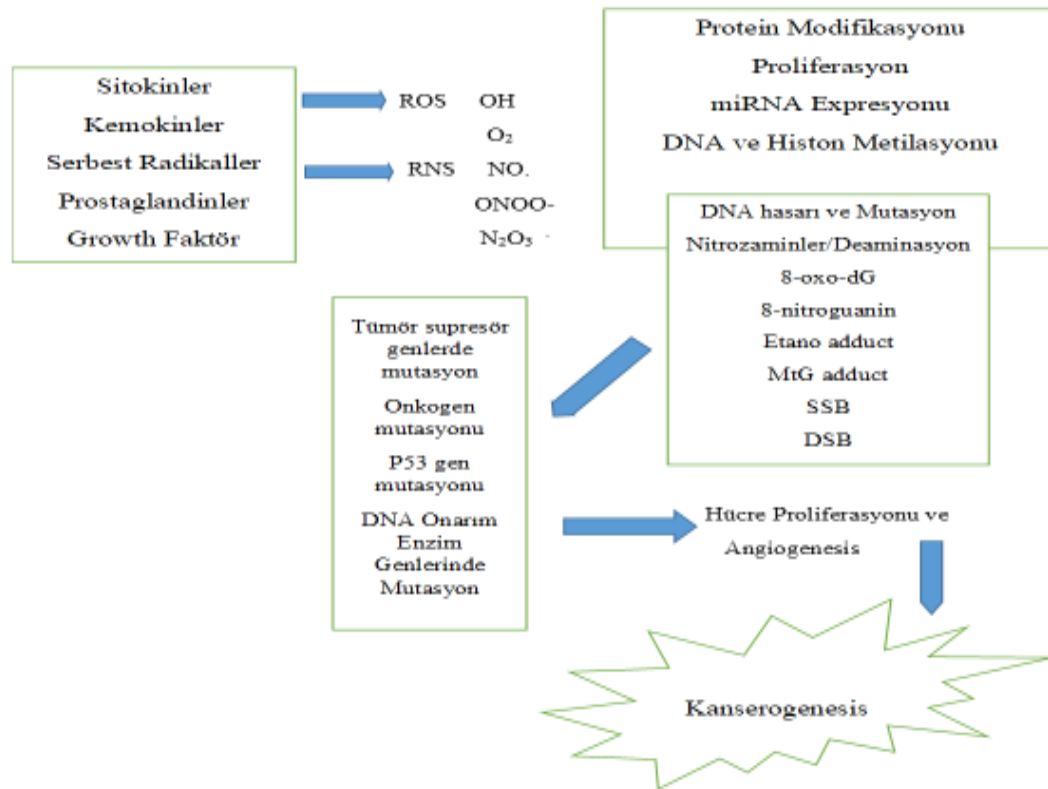
**Miyeloperoksidaz (MPO):** Myeloperoksidaz hemoglobine benzer şekilde prostetik grubunda hem grubu içeren bir enzimdir ve halide ionlar olan Cl, Br ve I'u hidrojen peroksit ile birlikte hipohalojenik aside dönüştürürler. Hidrojen peroksit, burada  $O_2^-$  in dismutasyonunda görev almaktadır (200).

Bu enzimlerin indüksiyonu ve aktivasyonu  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $INF-\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından gerçekleştirilmektedir. İnfamasyonlu dokuda oluşan çeşitli oksidan maddeler birbirleriyle etkileşime girebilir ve daha da potent hale gelebilirler. Örneğin bir serbest radikal olan ancak güçlü bir oksidan olmayan  $NO^-$ ,

$O_2^-$  ile reaksiyona girerek peroksinitrite ya da oksijenle reaksiyona girerek nitrojen okside ( $NO^*$ ) dönüşebilir. HOCl'in  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  ve nitrit ile reaksiyona girmesi sonucunda singlet oksijen ( $^1O^2$ ) ve hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ) ve nitril klorid ( $NO_2Cl$ ) oluşmaktadır. Asidik koşullarda aynı şekilde HOCl ve  $Cl^-$  den moleküler kloridin oluşabileceği bilinmektedir (198). ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi çeşitli hücresel bileşenlere hasar verme kapasitesine sahip oldukları, oksidatif ve nitratif DNA hasarına yol açarak karsinogenesisin gelişiminde önemli role sahip oldukları bildirilmiştir (201). ROS ve RNS türleri oksidasyon ( $OH\cdot, HOCl$ ), halojenasyon ( $HOCl$ ), alkilasyon, metilasyon, nitrasyon ( $N_2O_3, ONOO^-$ ), depürinasyon, deaminasyon ve abazik alanların oluşumu gibi çok geniş bir genotoksik etkiye sahiptir. Tüm bunlara ek olarak inflamasyon kaynaklı bu kimyasal mediatörlerin DNA da, zincir- içi ve zincirler- arası çapraz bağlanma, DNA-protein çapraz bağlanmaları, tek ve çift zincir kırıkları gibi çok daha kompleks modifikasyonlara yol açabileceği bildirilmiştir (1). İnflamasyon sırasında nötrofil ve makrofajlardan salınan NO'nin epitel hücrelerin ekstrasellüler matriksi boyunca yayılarak plasma membranını geçtiği ve nükleus içine girdiği,  $O_2^-$ 'in ise nükleus içindeki DNA ile etkileşime girebilecek kadar uzun ömürlü olmadığı ancak inflamatuvar hücreler tarafından salgılanan TNF- $\alpha$  dahil bazı sitokinlerin  $O_2^-$ 'nin komşu epitelyal hücrelerin etrafında birikmesini indükledikleri gösterilmiştir. NO'nin aşırı üretimi kanser dahil birçok patolojik olayların gelişimine neden olmaktadır. Kronik inflamasyonda iNOS'un sürekli indüksiyonu ile oluşan NO, süperoksit ( $O_2^-$ ) ile reaksiyona girerek peroksinitrite ( $ONOO^-$ ) dönüşür.  $ONOO^-$ , guaninle etkileşerek 8-nitroguanin ve 8-oxodG gibi nitratif ve oksidatif DNA hasarına yol açar. 8-nitroguanin bir inflamasyon markerı olmasının yanısıra mutajenik bir DNA hasarı olup karsinojenezin gelişimine neden olmaktadır. DNA zincirindeki deoksiriboz halkasına glikozidik bağ ile stabil olmayan bağlarla bağlanan 8-nitroguanin apürinik alanların oluşumuna neden olurlar. Bu apürinik alanlar ise çoğunlukla DNA sentezi sırasında adeninle eşleşir ve G→A transversiyonuna neden olur. 8-nitroguanin oluşumu *Helicobacter pylori*, hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV) ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi enfeksiyöz ajanlarla infekte klinik örneklerde gösterilmiş ve bundan dolayı IARC tarafından bu enfeksiyöz ajanlar grup-1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (200-203) ROS ve RNS DNA baz değişimlerinin yanısıra DNA

zincir kırıkları, protoonkogen ekspresyonundaki artış ve tümör supresör genlerin baskılanması yoluyla da hücrelerde malign değişimlerin gelişimine neden olabilirler (204, 205). Protein ve lipitler oksidatif ve nitratif saldırıların ana hedefidirler, RNS ve ROS proteinlerdeki aminoasit rezidüleriyle oksidasyon, nitratasyon ya da nitritasyon yoluyla reaksiyona girerek protein yapı ve fonksiyonlarında değişimlere yol açar ve kanser gelişimine neden olabilirler. Bu şekilde nükleotid sekansda değişime neden olmadan genomda meydana gelen değişimlere epigenetik değişimler adı verilmektedir. Bu tür epigenetik değişimlere örnek olarak; DNA metilasyonu, DNA asetilasyonu, histon modifikasyonu örnek olarak verilebilir. Bu tür epigenetik değişimler kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda inflamasyonlu dokularda nitratlanmış protein seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (206).

#### Kronik İnflamasyon



**Şekil 2.8.** Kronik inflamasyonun neden olduğu karsinojeniz gelişimi (199)

DNA hasarları içinde en tehlikelisi DNA çift zincir kırıkları olduğu bildirilmiştir. DNA çift zincir kırıklarının biyolojik açıdan önemi diğer DNA hasarlarına oranla onarımlarının çok daha karmaşık ve güç olmasından kaynaklanmaktadır. Kırılan DNA parçalarının yeniden yapışmasında oluşan hatalar sonucu kromozom materyalinde kayıp, kromozom parçalarının eşleşmesinde hata vb. mutasyonlar meydana gelebilmekte ve özellikle tümör supresör genlerde ya da protoonkogenlerde oluşan bu tür mutasyonlar tümör gelişimine yol açabilmektedir (164). Yapılan epigenetik çalışmalarda DNA çift kırıklarına yol açan pek çok endojen ve ekzojen faktörün olduğu gösterilmiştir. Radyasyon, UV-ışınlar, infrared radyomimetik ışınlar, bazı kemoteropatikler, doğal antibiyotikler (calicheamicin, esperamicin), ağır metaller (arsenik, metil civa), çevresel kimyasallar (benzen, phatalat), fungal toksinler (okratoksin), bakteriyel ajanlar (cytolethal toksin, ExoS, CagA), V(D)J rekombinasyonları, ROS/RNS nin DNA çift zincir kırıklarına neden oldukları bildirilmiştir (206). Hücresel homeostazın çeşitli ekzojen ajanlarla bozulması sonucu, çeşitli ekzojen faktörlerin neden olduğu kalsiyum bağımlı endonükleazların aktivasyonu, ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine alımında artış, hücre içi tampon sistemlerinde yetersizlik ya da akut yaralanma ve hücre ölümü sonucunda hücre içi kalsiyum miktarının artışı, kromatinlerde ve kromatidlerde kırılmalara neden olabilmekte ve sonuç olarak DSB meydana gelebilmektedir (207,208). DNA’da zincirler arası çapraz bağlanmalar, replikasyon ve transkripsiyonun bloke olmasına ve aynı zamanda onarım esnasında DNA’ da DSB’ye yol açabilir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda psöralenin çapraz bağlanması ile oluşan hasarın tamiri sırasında DNA DSB lerinin olduğu gözlenmiştir. DNA-DNA zincirler arası çapraz bağlanmaları veya büyük yapısal bükülmeler gibi kompleks DNA hasarının eksizyonu sırasında her iki DNA zincirinde onarımı gerektiğinden dolayı onarım sırasında çift kırıklar oluşabilmektedir. Sisplatin, busulfan, mitomisin C, 8-metoksipsöralen gibi bifonksiyonel alkilleyici ajanlar ve UVA’nın DNA-DNA çapraz bağlanmalarına ve çift kırıklarına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda endüstriyel ajanlardan toluen diisoksiyanat, metilen-4-4’-difenildiisoksisyanat ve aromatik aminlerin hidroliz ve dekarboksilasyon ürünleri bifonksiyonel alkilleyici özellikte olup, DNA-DNA çapraz bağlanmalarına ve çift zincir kırıklarına yol açtıkları gösterilmiştir (207). Diğer taraftan, çoklu hasarlı alanların eksizyon/insizyon yoluyla

onarımı sırasında da DBS oluşabilir. DBS'ler tipik olarak IR, UVC, UVA, genotoksik ajanlar, radyomimetikler ve alkilleyici ajanların indüksiyonu ile meydana gelen okside pürin ve pirimidin bazlarını, abazik alanları ve tek zincir kırıklarını kapsamaktadır. Bakteri ve memeli hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar çoklu hasarlı alanların onarımı sırasında lezyonlar arası uzaklığın ve onarım enzimlerinin yeteri kadar sentezlenip sentezlenmemesinin DSB oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir (208)

Biyolojik ajanlarla oluşan çift sarmal kırıkları ülseratif kolit, viral hepatit, prostatit, *Helicobacter pylori* infeksiyonu, parazitik hastalıklar ve diğer çeşitli kronik enflamatuvar hastalıklar intrasellüler oksidatif dengeyi bozarak, oksidatif strese ve takiben DNA lezyonlarına, onkogen aktivasyonuna veya tümör supresör genlerin inaktivasyonuna ve kanser gelişimine yol açabilirler (14).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma – Aldrich
8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanoszin) ELISA kiti	Mybiosource
BECN1 ELISA Kit (Beclin-1)	Aviva Systems
Brain Hearth Infussion Agar	Sigma - Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM Low Glucose)	Biowest
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (D-PBS)	Biowest
Florometrik Hücre içi ROS kiti	Aldrich
Sigma	
Fötal Sığır Serumu (FBS)	Biowest
Glutasyon kiti	Cayman Chemical
Glutasyon Peroksidaz kiti	Cayman Chemical
İnsan fosfo-H2AX ve Total H2AX Elisa Kit	Raybiotec
Helicobacter Supplement	OXOID
Hücre Liziz Reaktif (CellLytic MT)	Sigma – Aldrich
Kaspaz 3 Deney kiti	Mybiosource
Kaspaz 8 Deney kiti	Mybiosource
Katalaz kiti	Cayman Chemical
Light Chain 3B (MAP1LC3B) (LC3) Elisa Kit	Mybiosource
Hücre Liziz Tampon Çözeltisi Nu7441 (Ku-57788)	Sigma-Aldrich
OGG1 (8-Oxoguanine Glycosylase 1) Elisa Kiti	Selleckchem
P62 Elisa Kiti	Mybiosource
Penisilin-Streptomisin	Enzo
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Biological Industries
Protein Karbonil kiti	Sigma – Aldrich
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Cayman Chemical
Süperoksit Dismutaz kiti	RayBiotech
TBARS Deney kiti	Cayman Chemical
Tripsin-EDTA	Cayman Chemical
Tunikamisin	Sigma – Aldrich
	Abcam

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Greiner bio-one, Cellstar
Bakteri kültür plağı	IsoLab
Biyogüvenlik kabini	Holten, Lamin Air Model 1,2
Boyama cihazında	Leica EM AC20
CCD kamera	Gatan Inc., Pleasanton
Laboratuar tipi buz yapma cihazı	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES mp Minipure mes08
	Thermo Scientific
Elektron Mikroskop	JEOL-JEM 1400
Hassas Terazı	Mettler Toledo, XS105
Işık ve Faz Kontrast Mikroskobu	Leica, DFC280
İnkübatör (CO <sub>2</sub> 'li)	Heraeus Instruments Function Line
Kriyo tüp	Grenier Bio_One
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Otomatik pipet (1-10 µl, ,0,5-40 µl, 10 – 100 µ, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml)	Eppendorf, Finn pipette Lab systems
Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
pH metre	Isolab
Pipet ucu (0,5 – 10, 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl'lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A
	Molecular Devices
Spektrofotometre / Spektroflorometre	SpektraMax M2
Steril Santrifüj Tüpleri	Grenier Bio-One
Steril Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	Grenier Bio-One
Su Banyosu	Memmert, Edelstaht Rostfrei
Terazi	XS105 Dual Range
Ultra-mikrotom	Leica Ultracut R
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX 3000L

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre ve Bakteri Hattı

Çalışmada insan mide adenokarsinoma hücre hattı (AGS) ATCC®CRL-1739™ ve VagA ve CagA pozitif HP NCTC 11637 (ATCC 4350) standart *Helicobacter pylori* bakterisi suşu kullanılmıştır. AGS hücreleri epitel kökenli adheren hücrelerdir. 54 yaşındaki beyaz bir kadından elde edilen gastrik

adenokarsinoma hücreleridir. Hiperdiploid olan bu hücrelerin modal kromozom sayısı 49'dur ve bu hücrelerin %60'ında görülür. Poliploidi oranları %3,6'dır.

### **3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.4.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması**

Dulbecco's Modified Eagle Medyum (DMEM, 500 ml) içerisine %10 (50 ml) fetal sığır serumu (FBS) ve %1 (5,5 ml) penisilin streptomisin eklenerek hazırlanır ve 4°C'de saklanır.

*Helicobacter pylori* ile kokültürü yapılacak hücreler için bakteri ekimi öncesinde konulmak üzere, DMEM (500 ml) içerisine %10 (50 ml) FBS olarak antibiyotiksiz besiyeri hazırlanır ve 4°C'de saklanır.

#### **3.4.2. Nu7441'in hazırlanması**

Nu7441 (MW:413,49) den 10 mg (1 vial) 10 ml DMSO da çözülerek alikotlanır ve -80°C de saklanır. Son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde, bakteri grubuna bakteri ekiminden 2 saat önce ve kontrol grubuyla eş zamanlı olarak eklenir.

#### **3.4.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)**

##### **Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

##### **Dimetil Sülfoksit (DMSO):**

Dimetil sülfoksit (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) yoğunluğu 1,1 g/ml dir. Oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak saklanır.

##### **3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür Çözeltisi:**

15 mg 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tartılır; 3 ml DPBS içerisinde çözülür, üzerine 27 ml DMEM eklenerek 0,5 mg/ml konsantrasyondaki çözelti elde edilir. 24 saat dayanıklı olan MTT çözeltisi ışıktan korunmalıdır.

### 3.4.4. Işık Mikroskobu İncelemelerinde Kullanılan Çözeltiler

#### 0,1 M Fosfat Tamponu

20 ml disodyum hidrojen fosfat çözeltisi ve 80 ml sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karıştırılır ve bu karışıma 100 ml deionize su eklenir. Çözeltinin pH'sı 7,42'ye ayarlanır. 4°C'de 4 ay dayanıklıdır.

#### Metilen Mavisi (%1, a/h):

1 g metilen mavisi ve 1 g disodyum tetrahydroborat tartılır, 100 ml deiyonize suda çözülür.

#### Azur II Çözeltisi (%1, a/h):

1 g Azur II 100 ml deiyonize suda çözülür.

#### %1'lik Metilen Mavisi – Azur II Çözeltisi:

50 ml metilen mavisi çözeltisi ve 50 ml Azur II çözeltisi karıştırılır.

#### %2,5'lik Gluteraldehit Çözeltisi:

10 ml %25'lik gluteraldehit ve 90 ml deionize su eklenerek hazırlanır.

#### %2'lik Agar

12,5 distile su içine 0,25 gr agar konulmuş, kısık ateşte Benmari usulü, şeffaflaşınca kadar kaynatılıp, etüve konulur.

### 3.4.5. AGS Hücrelerinin Lizisinde Kullanılan Çözeltiler

#### Lizis Tampon Çözeltisi

CellLytic™ MT lizis reaktifi hücrelerin lizisi için kullanılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda deterjan, bisin ve 150 nM NaCL içermekte olup proteinlerle minimal düzeyde girişime neden olmaktadır. +4°C'de saklanır.

### **Proteaz İnhibitörü**

Serin, aspartik proteaz ve aminopeptidazları inhibe eder. Pepstatin A, lökopeptin, bestatin, aprotinin ve E-64 içerir-20 °C'de saklanır.

### **Proteaz İnhibitör Kokteyli**

100 ml lizis tamponu çözeltisine 1 ml proteaz inhibitörü eklenir.

### **3.4.6. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **QuantiPro Buffer QA**

Reaktif QA 0,2 M NaOH içerisinde sodyum tartarat, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat içeren 250 ml'lik bir çözeltidir (pH 11,25). Kullanıma hazırdır.

#### **QuantiPro BCA QB**

%4'lük bisinkoninik asit (BCA) içeren 250 ml'lik çözeltidir (pH 8,5). Kullanıma hazırdır.

#### **Bakır (II) Sülfat**

Kit 12 ml %4'lük bakır(II)sülfat pentahidrat çözeltisi içerir. Kullanıma hazırdır.

#### **Protein Stok ve Standart Çözeltileri:**

Stok protein 1 ml'lik çözelti halinde olup, koruyucu olarak %0,05 sodyum azid ve 0,15 M NaCl'de 1,0 mg/ml sıgır serum albümini içerir. 0; 0,5; 5; 10; 20; 30; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında protein standart çözeltileri stok protein çözeltisi ve deionize su kullanılarak hazırlanır.

### **3.4.7. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **ROS Tayin Reaktifi**

Kit 1 ml (1 vial) ROS tayin reaktifi içerir. 40 µl DMSO eklenerek stok solüsyonu hazırlanır ve alikotlanarak -20 ° C'de saklanır.

**Dimetil Sülfoksit**

Kit 0,2 ml DMSO içerir. Kullanıma hazırdır.

**Deney Tamponu**

20 ml olarak kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunur. -20 ° C'de 1 ay stabildir.

**Master Reaksiyon Karışımı**

20 µl 500X ROS tayin reaktifi üzerine 10 ml deney tamponu eklenir. -20°C'de 1 ay stabildir.

**3.4.8. Glutasyon Peroksidaz 1 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler****Deney Tamponu (10X):**

Kit 3 ml deney tamponu içerir ve 27 ml deionize su ile dilüsyon yapılarak 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, 5 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. 4°C'de 6 ay stabildir.

**Örnek Tamponu (10X):**

2 ml örnek tamponu 18 ml deionize su ile dilüsyon yapılarak 1X çözeltisi elde edilir. 1X çözelti, 5 mM EDTA ve 1 mg/ml BSA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) tamponudur. GPx kontrol çözeltisini ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de 6 ay stabildir.

**Glutasyon Peroksidaz Kontrol**

Kit 50 µl sığır eritrosit GPx'i içerir. 10 µl enzim 490 µl 1X örnek tamponu ile seyreltilip 4 saat içerisinde kullanılır. -20°C'de saklanmalıdır.

**Ko – Substrat Karışımı**

Kit liyofilize toz halinde NADPH, GSH ve GR içerir. 6 ml distile suda çözülerek kullanılır. Deney sırasında reaktif 25°C'de bekletilir. 4°C'de 2 gün stabildir.

### **Kümen Hidroperoksit**

2.5 ml kümen hidroperoksit kullanıma hazır olarak kit içerisinde bulunmaktadır. -20°C'de saklanmalıdır.

### **3.4.9. Katalaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Deney Tamponu (10X)**

Kit 5 ml katalaz deney tamponu içerir. 1X çözelti elde edisi için 1 ml CAT deney tamponu 19 ml deionize su ile dilue edilir. 1X çözelti, 100 mM potasyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. 4°C'de saklanır.

#### **Örnek Tamponu (10X)**

Kit 10 ml katalaz örnek tamponu içerir. 3 ml katalaz örnek tamponu 27 ml distile su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir. 1X çözelti, %0,1 sığır serum albümin ve 1 mM EDTA içeren 25 mM potasyum fosfat (pH 7,5) tamponudur. Elde edilen örnek tamponu analizden önce formaldehit standartlarını ve örnekleri seyreltmek için kullanılır. 4°C'de saklanır.

#### **Formaldehit Stok ve Standart Çözeltileri**

Kit 100 µl (1 vial) 4.25M formaldehit stok çözeltisi içermektedir. 4,25 mM formaldehit ara stok çözeltisi hazırlamak için stok formaldehit çözeltisinden 10 µl alınıp 9,99 ml seyreltilmiş örnek tamponu ile seyreltilir. Sırasıyla 0, 5, 15, 30, 45, 60 ve 75 µM konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlamak için ara stok çözeltisinden 0 µl, 10 µl, 30 µl, 60 µl, 90 µl, 120 µl ve 150 µl formaldehit alınır ve yine sırasıyla 1000 µl, 990 µl, 970 µl, 940 µl, 910 µl, 880 µl, 850 µl 1X örnek tamponundan alınarak seyreltme yapılır.

#### **Katalaz Pozitif Kontrol**

Kit liyofilize toz halde sığır karaciğer katalaz enzimi içerir. 2 ml 1X örnek tamponu ile dilüe edilerek, her 100 µl sine 1,9 ml 1X örnek tamponu eklenerek alikotlanır ve -20°C de saklanır.

### **Potasyum Hidroksit**

4 ml 10M potasyum hidroksit (KOH) içeren kit kullanıma hazırdır. 4°C’de saklanır.

### **Hidrojen Peroksit**

Kit 8,82 M hidrojen peroksit vialı içerir. 35,28 mM çözelti elde etmek amacıyla 40 µl alınarak 9,96 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti 2 saat stabildir.

### **Purpald (Kromojen)**

Kit 4ml (1 vial) 0,5 M hidroklorik asit (HCl) içerisinde hazırlanmış 4 ml “4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol (purpald)” içerir. Kullanıma hazırdır. 4°C’de saklanır.

### **Potasyum Periyodat**

Kit 0,5M potasyum hidroksit içerisinde 1,5 ml potasyum periyodat içerir. Kullanıma hazırdır. 4°C’de saklanır.

## **3.4.10. Süperoksit Dismutaz Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

### **Deney Tamponu (10X)**

2 ml deney tamponu 18 ml distile su ile seyreltilerek 1X deney tamponu elde edilir ve radikal detektörü seyreltmek için kullanılır. 1X çözelti, 0,1 mM hipoksantin ve 0,1 mM dietilen triamin pentaasetik asit (DTPA) içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. 4°C’de 2 ay stabildir.

### **Örnek Tamponu (10X)**

50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponudur. Örnek tamponundan 2 ml alınıp ve 18 ml deionize su ile dilüsyon yapılarak 1X örnek tamponu elde edilir. SOD standartlarını hazırlamak, ksantin oksidazı ve SOD örneklerini seyreltmek kullanılır. 4°C’de 6 ay stabildir.



### **Radikal Detektör**

250 µl tetrazolyum tuzu çözeltisi içerir. Bu çözeltiden 25 µl alınıp 19,975 ml 1X deney tamponu ile dilüsyon yapılır. Işıktan korunmalı ve 2 saat içerisinde kullanılmalıdır.

### **SOD Stok ve Standart Çözeltileri**

Kit 100 µl Cu/Zn-SOD şeklinde sığır eritrosit SOD stok çözeltisi içermektedir. SOD standart çözeltileri örnek tamponu ile dilüsyon yapılarak hazırlanır. 20 µl SOD stok çözeltisine 1,98 ml 1X örnek tamponu eklenerek seyreltilir. 1/100 oranında seyreltilen SOD stok çözeltisinden sırasıyla; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 ve 0,05 U/ml SOD aktivitesine sahip bir seri standart çözelti hazırlamak amacıyla, sırasıyla 0 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 120 µl, 160 µl ve 200 µl alınarak, 1000 µl, 980 µl, 960 µl, 920 µl, 880 µl, 840 µl ve 800 µl örnek tamponu eklenerek dilüsyon yapılır. Standart çözeltiler taze olarak hazırlanmalıdır.

### **Ksantin Oksidaz**

Kit 150 µl ksantin oksidaz içerir. 25 µl 1,975 ml örnek tamponu ile seyreltilir. Seyreltilmiş enzim bir saat dayanıklı olup buzda bekletilerek çalışılır.

### **3.4.11. Total Glutasyon (GSH) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **GSH MES Tamponu(2X):**

Kit 60 ml (1 vial) GSH MES tamponu içerir. .MES[2-(N-morfolin) etansülfonik asit] ; 2 mM EDTA ve 0,1 M fosfattan oluşmaktadır (pH 6,0). 1/1 oranında deionize su ile seyreltilerek 1X çözelti elde edilir.4°C' de saklanır.

#### **GSH Standart**

Kit (1 vial) kullanıma hazır, MES tamponu içinde 2 ml 25 µM GSSG standardı içerir. 0-4°C' de saklanır. GSSH stok çözeltisinden sırasıyla 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160 µl alınarak yine sırasıyla 500, 495. 490, 480, 460, 380, 340 µl MES tampon çözeltisi eklenerek 0 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM konsantrasyonlarında GSH standart çözeltileri hazırlanır.

### **GSH Ko-Faktör Karışımı**

Kit, liyofilize toz halinde (1vial) NADP<sup>+</sup> ve glukoz-6-fosfat içermektedir. Kullanmadan önce 0,5 ml deionize suda çözülür. 0 - 4°C'de 2 hafta stabildir.

### **GSH Enzim Karışımı**

Kit (1vial) 0,2 ml tampon çözelti içinde GR ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz içermektedir. 1X MES tampon çözeltisinden 2 ml eklenerek seyreltilir. 0 - 4°C'de 2 hafta stabildir.

### **5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB)**

Kit, liyofilize 5,5'-diti-bis-(2-nitrobenzoik) asit (DTNB, Ellman reaktifi) içerir. Vial 0,5 ml deiyonize su ile çözülür. 10 dakika içerisinde kullanılmalıdır.

### **3.4.12. Total Antioksidan Kapasite (TAOC) belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Reaktif 1 Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır, 0.4 mol/L (pH 5.8) tampon çözeltisi ve hızlandırıcı tampondan oluşan karışım içerir. +2-8°C de stabildir.

#### **Reaktif 2 Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır 30 mmol/L prokromojen ve ABTS çözeltisi içerir. +2-8°C de stabildir.

#### **Standart Çözeltisi**

Kit içersinde kullanıma hazır 1 mmol/L trolox içeren çözelti halindedir. 2-8°C'de stabildir.

#### **QC 1 Çözeltisi**

Kit içersinde kullanıma hazır Trolox çözeltisi (0.5 mmol/L) bulunur. 2-8°C de stabildir.

## **QC 2 Çözeltisi**

Kit içersinde kullanıma hazır Trolox çözeltisi (2.0 mmol/L) bulunur. 2-8°C de stabildir.

### **3.4.13. Lipit Peroksidasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Asetik Asit**

Kit 20 ml konsantre asetik asit içerir. Renk reaktifi hazırlamak için 40 ml asetik asit 160 ml deionize su ile dilüe edilir. Oda sıcaklığında 3 ay stabildir.

#### **Sodyum Hidroksit (10X)**

1X çözelti elde etmek için 20 ml NaOH çözeltisi 180 ml deionize su ile seyreltilir ve renk reaktifi hazırlamak için kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay stabildir.

#### **Tiyobarbitürik Asit**

Kit 2 g tiyobarbitürik asit (TBA) içerir. Renk reaktifinin hazırlanmasında kullanılır. 530 mg TBA, 50 ml seyreltilmiş asetik asit çözeltisi ve 50 ml seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi içinde çözülerek hazırlanan renk reaktifi çözeltisi 24 saat stabildir.

#### **Malondialdehit Stok ve Standart Çözeltileri**

Kit, kullanıma hazır 500 µM MDA stok çözeltisi içerir. 125 µM ara stok çözeltisi elde etmek için 250 µl MDA stok çözeltisi 750 µl deionize su ile dilue edilir. Ara stok çözeltisi ve deionize su ile 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50 ve 75 µM konsantrasyonlarında MDA standartları hazırlanır.

#### **Sodyum Dodesil Sülfat Çözeltisi**

Kit, kullanıma hazır olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi içerir.

### **3.4.14. Protein Karbonil Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Hidroklorik Asit**

Kit 12 M HCl içerir. 2,5 M HCl elde etmek amacıyla 40 ml deionize suya 1 ml HCl çözeltisi eklenir DNPH in dilüsyonunda kullanılır. Oda sıcaklığında 3 ay stabildir.

#### **2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)**

2,5 M 10 ml HCl içerisinde DNPH çözülür. 4°C’de 1 hafta stabil olup ışıktan korunmalıdır.

#### **TCA (Trikloroasetik Çözeltisi)**

Kit 1 g/ml trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi içerir. %20’lik TCA çözeltisi eldesi için 12 ml TCA çözeltisi 48 ml deionize su ile dilue edilir. Daha sonra %20

TCA çözeltisinin 20 ml’sine 40 ml distile su eklenerek %10’luk TA çözeltisi elde edilir. Oda sıcaklığında 1 ay stabildir.

#### **Guanidin Hidroklorür**

Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

#### **Etanol**

Kit içerisinde 30 ml olarak kullanıma hazırdır.

#### **Etil Asetat**

Kit içerisinde 30 ml olarak kullanıma hazırdır.

#### **Etanol - Etil Asetat**

1:1 oranında etanol:etil asetat çözeltisi elde etmek amacıyla,30 ml etil alkole 30 ml etanol eklenir.

### **3.4.15. 8-OHdG (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) ölçümünde kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Çözeltisi 25X**

Kit konsantre halde yıkama çözeltisi içerir.1/25 oranında deionize su ile dilüsyon yapılarak kullanılır.

#### **8-OHdG Standartı**

Kit liyofilize toz halde insan 8-OHdG standartı içerir. 1 ml standart dilüenti ile seyreltilerek 10 ng/ml'lik stok standart çözeltisi elde edilir. Elde edilen stok standart çözeltisine 300 ul örnek seyreltme çözeltisi eklemek suretiyle sırasıyla 5 ng/ml; 2.5 ng/ml; 2.5 ng/ml; 1.25 ng/ml; 0.625 ng/ml; 0.312 ng/ml: 0.156 ng/ml lik standart serileri hazırlanır. Negatif kontrol olarak örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 30 dakika içinde kullanılır.

#### **Biotinli İnsan 8-OHdG antikor Çözeltisi**

Kit liyofilize halde biotinli insan 8-OHdG antikorunu içerir. Antikor dilüenti ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 30 dakika içinde kullanılır.

#### **Enzim Konjugat Çözeltisi**

Kit liyofilize toz halde enzim konjugatı içerir.1/100 oranında enzim konjugat seyreltme çözeltisi ile dilüe edilir. Deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 30 dakika içinde kullanılır.

#### **Standart Seyreltme Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır standart seyreltme çözeltisi içerir.

#### **Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır standart seyreltme çözeltisi içerir.

**Renk Reaktifi A**

Kit kullanıma hazır standart renk reaktifi A içerir.

**Renk Reaktifi B**

Kit kullanıma hazır standart renk reaktifi B içerir.

**Renk Reaktifi C**

Kit kullanıma hazır standart renk reaktifi C içerir.

**3.4.16. OGG1 Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler****Yıkama Çözeltisi 25X**

Kit konsantre halde yıkama çözeltisi içerir.1/25 oranında deionize su ile dilüsyon yapılarak kullanılır.

**OGG1 Standartı**

Kit liyofilize toz halde insan OGG1 standartı içerir. 1 ml standart dilüenti ile seyreltilerek 10 ng/ml'lik stok standart çözeltisi elde edilir. Elde edilen stok standart çözeltisine 300 ul örnek seyreltme çözeltisi eklemek suretiyle sırasıyla 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,63 ng/ml; 0,32 ng/ml; 0,16 ng/ml lik standart serileri hazırlanır. Negatif kontrol olarak örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 30 dakika içinde kullanılır.

**Biotinli İnsan OGG1 antikor Çözeltisi**

Kit liyofilize halde biotinli insan 8-OHdG antikorunu içerir. Antikor dilüenti ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 30 dakika içinde kullanılır.

### **Enzim Konjugat Çözeltisi**

Kit liyofilize toz halde enzim konjugatı içerir.1/100 oranında enzim konjugat seyreltme çözeltisi ile dilüe edilir. Deney sırasında taze olarak hazırlanır ve 30 dakika içinde kullanılır.

### **Standart Seyreltme Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır standart seyreltme çözeltisi içerir.

### **Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır standart seyreltme çözeltisi içerir.

### **Renk Reaktifi A**

Kit kullanıma hazır standart renk reaktifi A içerir.

### **Renk Rzeaktifi B**

Kit kullanıma hazır standart renk reaktifi B içerir.

### **Renk Reaktifi C**

Kit kullanıma hazır standart renk reaktifi C içerir.

### **3.4.17. H2AX Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu (20X):**

Kit 25 ml 20X konsantre yıkama tampon çözeltisi içerir.10 ml yıkama tamponu 190 ml deionize su ile seyreltilerek 1X yıkama tamponu elde edilir. 4°C de 1 ay stabildir.

#### **Seyreltme Tamponu (5X)**

Kit 15 ml konsantre tampon içerir.15 ml tampon çözeltisine 75 ml deionize su eklenerek 1X seyreltme tamponu elde edilir. 4°C de 1 ay stabildir.

### **Hücre Liziz Tamponu (1X)**

Kit 10 ml 2X hücre liziz tamponu içerir 1/2 oranında seyreltme tamponu ile dilüe edilerek kullanılır. Bu tampon proteaz ve fosfataz inhibitörleri içermemektedir.4°C de 1 ay stabildir.

### **Pozitif Kontrol**

Kit 1 vial liyofilize toz halinde Jurkat hücre lizati içerir. 400 µl 1X deney dilüenti eklenerek dilüsyon yapılır.-80°C de 1 hafta stabildir.

### **Fosfo-H2AX Antikor**

Kit 1 vial tavşan anti-pan-fosfo-H2AX antikorunu içerir.100 µl deney tampon çözeltisi ile seyreltilir. 4°C de 5 gün ya da -80°C de 1 ay stabildir.

### **Pan H2AX Antikor**

Kit 1 vial tavşan anti-Pan-H2AX antikorunu içerir. 100 µl deney tampon çözeltisi ile seyreltilir.+4°C de 5 gün ya da -80°C de 1 ay stabildir.

### **HRP-konjuge anti-rabbit IgG (1000X)**

Kit 1 vial 25 µl 1000X konsantre anti-rabbit IgG içerir.1/1000 oranında 1X deney tamponu ile dilüe edilerek kullanılır.+4°C de 1 ay stabildir.

### **3.4.18. Kaspaz 3 Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **Yıkama Tamponu**

Konsantre yıkama tamponu kit içersinde 30 ml olarak bulunmaktadır. 1/25 oranında deiyonize su ile seyreltilerek kullanılır.

#### **Standart Çözeltileri**

Stok standart çözeltisi kit içersinde 20 ng/ml ve hazır olarak bulunmaktadır. Standart dilüsyon çözeltisi ile 0; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5 ve 10 ng/ml konsantrasyonları elde edecek şekilde dilüsyon yapılır.



**Primer Antikor Dilüsyon Çözeltisi**

Kit içinde hazırdır. 4°C’de saklanır.

**Primer Antikor Çözeltisi**

Biotin-işaretili antikor, primer antikor dilüsyon çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

**Sekonder Antikor Dilüsyon Çözeltisi**

Kit içinde hazırdır ve +4°C’de saklanır.

**Sekonder Antikor Çözeltisi**

Yaban turbu peroksidaz (Horse radish peroxidase, HRP)-Streptavidin konjuge antikor, sekonder antikor dilüsyon çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

**3.4.19. Kaspaz 8 Tayininde Kullanılan Çözeltiler****Yıkama Tamponu**

30 ml konsantre yıkama tamponu kit içersinde hazırdır. Deionize su ile 1/25 oranında seyreltilerek kullanılır.

**Standart Çözeltileri**

10 ng/ml stok çözeltisi kit içersinde hazırdır ve standart dilüsyon çözeltisi ile 0; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5 ve 5 ng/ml konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlanmıştır.

**Primer Antikor Dilüsyon Çözeltisi**

Kit içinde hazırdır. +4°C’de saklanır.

**Primer Antikor Çözeltisi**

Biotin-işaretili antikor primer antikor dilüsyon çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

### **Sekonder Antikor Dilüsyon Çözeltisi**

Kit içinde hazırdır. +4°C’de saklanır.

### **Sekonder Antikor Çözeltisi**

HRP-Streptavidin konjuge antikor sekonder antikor dilüsyon çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

### **3.4.20. BECN1(Beclin-1) Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **BECN1 Standartı**

Kit 10 ng (1vial) liyofilize toz standart içerir. 1 ml örnek seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek 10 ng/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi elde edilir. Elde edilen 10 ng/ml lik konsantrasyondan 300 µl ve örnek seyreltme çözeltisinden 300 µl alınıp, ve sonrasında 1/2 oranlarında ardışık olarak seyreltmek suretiyle sırasıyla 5 ng/ml; 2.5 ng/ml; 1.25 ng/ml; 0.625 ng/ml; 0.313 ng/ml; 0.156 ng/ml ve 0.0 (kör) konsantrasyonlarında standart serileri elde edilir. -20°C de 6 ay stabildir.

#### **Antikor Seyreltme Çözeltisi**

Kit 12 ml kullanıma hazır seyreltme çözeltisi içerir. -20°C de 6 ay stabildir.

#### **Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit 20 ml örnek seyreltme çözeltisi içerir. Kullanıma hazırdır. -20°C de 6 ay stabildir.

#### **Konjugat Seyreltme Çözeltisi**

Kit 12 ml kullanıma hazır seyreltme çözeltisi içerir. -20°C de 6 ay stabildir.

#### **100X Biotinli BECN1 Antikor Çözeltisi**

Kit 120 µl 100X biotinli BECN1 Antikor çözeltisi içerir. -20°C de 6 ay stabildir.

### **1X Biotin Antikor çözeltilisi**

100X Biotinli BECN1 antikor çözeltilisinin antikor seyreltme çözeltilisi ile 1/100 oranında seyreltilmesiyle elde edilir. -20°C de 6 ay stabildir.

### **100X Avidin-HRP Konjugatı**

Kit 120 µl 100X Avidin- HRP konjugatı içerir. 1/100 oranında antikor seyreltme çözeltilisi ile seyreltilerek 1X Avidin-HRP konjugat çözeltilisi elde edilir. -20°C de 6 ay stabildir.

### **25X Yıkama Çözeltilisi**

Kit 30 ml konsantre yıkama çözeltilisi içerir. 720 ml deionize su ile seyreltilmesi ile 1X yıkama çözeltilisi elde edilir. +4 /+6°C de 6 ay stabildir.

### **3.4.21. LC3 (MAP1 LC3 B) Protein Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **LC3 (MAP1 LC3 B) Standartı**

Vial içinde bulunan standart, 1 ml örnek dilüenti ile seyreltilerek 1200 pg/ml lik konsantrasyondaki stok çözeltilisi elde edilir. Bu stok çözeltilisinden ardaşık olarak 1/2 oranındaki dilüsyonlarla sırasıyla 600 ng/ml; 300 ng/ml; 150 ng/ml; 75 ng/ml; 37.5 ng/ml; 18.75 ng/ml ve 0.0 ng/ml (kör) konsantrasyonlarındaki standart çözeltili serisi elde edilir. 2-8°C de 1 ay ya da -20°C de son kullanım tarihine kadar stabildir.

#### **Biotin Antikor Seyreltme Çözeltilisi**

Kit kullanıma hazır halde 15 ml biotin antikor seyreltme çözeltilisi içerir. +2/+8°C de 1 ay ya da -20°C de son kullanım tarihine kadar stabildir.

#### **100X Biotin Antikor Çözeltilisi**

Kit 120 µl konsantre biotin antikor çözeltilisi içerir. 50 µl konsantre biotin çözeltilisi 4950 µl biotin antikor seyreltme çözeltilisi ile seyreltilerek 1X çözeltili elde edilir. +2/+8°C de 1 ay ya da -20°C de son kullanım tarihine kadar stabildir.

### **HRP-Avidin Seyreltme Çözeltisi**

Kit 15 ml kullanıma hazır HRP-Avidin seyreltme çözeltisi içerir. 2-8°C de 1 ay ya da -20°C de son kullanım tarihine kadar stabildir.

### **100X HRP-Avidin Çözeltisi**

Kit 12 µl konsantre halde HRP-Avidin çözeltisi içerir. 10 µl si 990 µl HRP-avidin seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek 1X HRP-avidin çözeltisi elde edilir. 2-8°C de 1 ay ya da -20°C de son kullanım tarihine kadar stabildir.

### **Örnek Seyreltme Çözeltisi**

Kit kullanıma hazır 20 ml örnek seyreltme tamponu içerir. 2-8°C'de stabildir.

### **25X Yıkama Tamponu**

Kit 20 ml konsantre halde yıkama tamponu içerir.480 ml deionize suyla seyreltilerek 1X yıkama tampon çözeltisi elde edilir. 2-8°C de stabildir.

### **TMB Substrat Çözeltisi:**

Kit kullanıma hazır 10 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi içerir. 2-8°C de stabildir.

### **Durdurma Çözeltisi**

Kit 10 ml kullanıma hazır durdurma çözeltisi içerir. 2-8°C de stabildir.

### **Deney tampon Çözeltisi**

Kit hazır halde 100 ml deney tampon çözeltisi içerir.+4°C de saklanır.

### **3.4.22. P62 Protein Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **p62 Standartı**

Kit 0.05 ml (2 µg/ml) rekombinant p62 standartı içerir.490 ul deney tamponu ile seyreltilerek 40 ng/ml lik konsantasyon elde edildikten sonra, deney tamponu ile

ardaşık olarak 1/1 seyreltme yapılarak sırasıyla 20 ng/ml; 10 ng/ml; 5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 1,25 ng/ml ve 0,625 ng/ml lik konsantrasyonlardaki standart serileri elde edilir.+4°C de saklanır.

### **P62 Antikor Çözeltisi**

Kit 10 ml p62 antikorunu içerir. +4°C de saklanır.

### **P62 konjugat Çözeltisi**

Kit 10 ml p62 IgG konjugatı içerir .+4°C de saklanır.

### **RİPA Hücre Liziz Tamponu**

Kit 100 ml hazır halde liziz tamponu içerir.+4°C de saklanır.

### **Yıkama Tamponu**

Kit konsantre halde 30 ml yıkama çözeltisi içerir.570 ml deionize su ile seyreltilerek kullanılır. Oda sıcaklığında saklanır.

### **TMB Substratı**

10 ml hazır halde TMB substratı içerir. +4°C de saklanır.

### **Durdurma Çözeltisi**

Kit hazır halde 10 ml durdurma çözeltisi içerir. +4°C de saklanır.

## **3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler**

### **3.5.1. Hücre Kültürü**

Çalışmada AGS hattı (ATCC CRL-1739) kullanılmıştır. AGS hücre hattı insan gastrik adenokarsinoma hücrelerinden elde edilen adherent ve epitel kökenli hücre hattıdır.

Hücre ekimi DMEM (%10 FBS ve %1 penisilin streptomisin içeren) içerisinde 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür plaklarına yapılmış ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde uygun aralıklarla

besiyeri değiştirilmiş; uygun zamanlarda pasajlanarak AGS hücreleri çoğaltılmıştır. NCTC11637 *Helicobacter pylori* suşu ile kokültürü yapılacak hücre grubunda antibiyotiksiz besiyeri kullanmıştır. DNA onarım enzim inhibitörü olan Nu7441 dozu 10 µM olarak belirlenmiş ve bakteri grubuna bakteri ekiminden 2 saat önce ve kontrol grubuyla eş zamanlı olarak eklenmiştir.

### 3.5.2. Bakteri Kültürü

Çalışmada *Helicobacter pylori* suşu (NCTC 11637) kullanılmıştır. Mikroaerofilik koşullarda kanlı columbia agara ekilen *Helicobacter pylori* DPBS ile inoküle edilmiş ve tez çalışması kapsamında, AGS hücrelerine ekilmiştir. Çalışma gruplarının IC30 ve IC50 değerlerinin belirlenmesi MTT deneyi ile tayin edilmiştir.

**Tablo 3.1.** AGS hücre hattı ile ko-kültürü yapılacak olan bakterilerin IC30 değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 24 saatlik inkübasyon da kullanılan infeksiyon çokluğu (Multiplicity of Infection, MOI, bir canlı memeli hücresi başına kaç adet bakteri hücrelerinin tekabül edeceği) değerleri

MOI Değeri	<i>Helicobacter pylori</i> /10 µL	2 ml DPBS içindeki <i>Helicobacter pylori</i> miktarı
MOI 25	250.000	5x10 <sup>7</sup>
MOI 50	500.000	1x10 <sup>8</sup>
MOI 75	750.000	15x10 <sup>7</sup>
MOI 100	1000.000	2x10 <sup>8</sup>
MOI 150	1500.000	3x10 <sup>8</sup>
MOI 200	2000.000	4x10 <sup>8</sup>

**Tablo 3.2.** MTT deneyi ile tayin edilen *Helicobacter pylori*/Nu7441/AGS ve *Helicobacter pylori*/AGS grubuna ait IC<sub>30</sub> dozları.

Gruplar	Maruziyet	İnkübasyon Süresi
Kontrol	-	24 saat
Nu7441/ Kontrol	10 µM Nu7441 eklenmiş AGS hücreleri	24 saat
<i>Helicobacter pylori</i> ve AGS Hücre	MOI142 <i>Helicobacter pylori</i> ile kokültürü yapılmış AGS hücreleri	24 saat
<i>Helicobacter pylori</i> ve Nu7441/ AGS	10µM Nu7441 eklenip MOI 94 <i>Helicobacter pylori</i> ile kokültürü yapılmış AGS hücreleri	24 saat

İnhibitör konsantrasyon 30 (IC<sub>30</sub>), hücre canlılığında %30 inhibisyona neden olan konsantrasyonu ifade etmektedir.

### 3.5.3. Uygun Hücre Sayılarının Belirlenmesi

1. Flaskta tutunmuş AGS hücreleri üzerinden besiyeri çekilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır.
2. Flaska tutunmuş hücreler 4 ml DPBS çözeltisi ile ikişer kez yıkanmıştır.
3. Flaska 4 ml tripsin-EDTA eklenmiş, hücreler 3–5 dk inkübatörde tutulmuş ve hücrelerin tutundukları yerden ayrılıp süspande olmaları sağlanmıştır.
4. Işık mikroskopunda hücrelerin süspande olup olmadıkları kontrol edilmiştir.
5. Flask üzerine tripsin-EDTA'nın etkisini ortadan kaldırmak amacıyla 4 ml besiyeri eklenmiştir.
6. 4 ml besiyeri eklenen steril Falkon tüpe Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler aktarılmış ve besi yeri 10 ml'ye tamamlanmıştır.
7. Hücre süspansiyonu 1200 devir/dak hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılmıştır.
8. Hücre pelleti 6 ml besiyeri ile süspande edilmiştir.
9. Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak steril bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 50 µl %0,4 lük tripan mavisi çözeltisi eklenerek süspande edilmiştir.

10. Hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım lamı üzerinde ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Neubauer hücre sayım lamının üst ve alt kısımlarında bulunan dört karenin kenar çizgileri üzerindeki hücreler hariç, karelerdeki hücreler soldan sağa ilerleyerek sayılmıştır. Sekiz ayrı kareden elde edilen hücre sayılarının ortalamaları alınarak ml'deki canlı hücre sayısı;
11. Toplam hücre/ml=Sayılan toplam hücre sayısı x (dilüsyon faktörü /hücre sayım lamında sayılan kare sayısı) x 10.000 hücre/ml formülü kullanılarak hesaplanmıştır
12. Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, her bir kuyucukta 10.000 hücre/90 µl olacak şekilde seyreltilmiş, 96 kuyucuklu plağa hücre ekimi yapılmıştır.
13. Hücrelerin 37°C de 24 saatlik inkübasyon süresince kuyucuklara tutunması ve çoğalması sağlanmıştır.

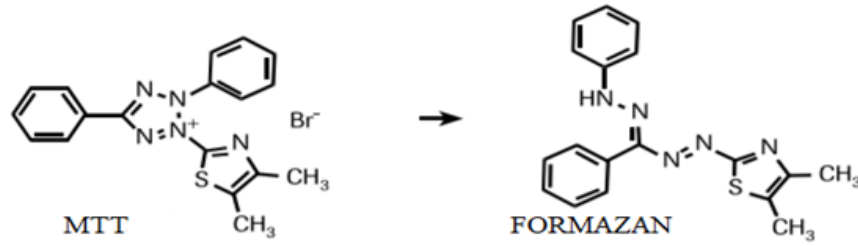
#### **3.5.4. AGS Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi**

##### **Yöntemin Esası**

Kolorimetrik deney sistemi olan MTT yöntemi, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür ile gerçekleştirilen ve radyoaktif izotoplar kullanmadan spektrofotometrik olarak hücre büyümesi ve canlılığının tayini için tasarlanmıştır. Hücre aktivasyonu ve sitotoksisitenin ölçümünün yanı sıra büyüme faktörleri, sitokinler ve besin ögelerine yanıt olarak hücre proliferasyonunun ölçümü amacıyla kullanılan bir yöntemdir (208)

Yöntemin esası, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile sarı renkteki tetrazolyum tuzunu (MTT) kullanarak mor renge dönüştürmesi ve oluşan renk şiddetinin spektrofotometre ile 570 nm'de ölçülmesine dayanır (Şekil 3.1). Hücresel indirgenme, piridin nükleotid kofaktörleri NADH ve NADPH ile gerçekleşmektedir (209)





**Şekil 3.1.** Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuza dönüşüm metabolizması

### Yöntemin Uygulanışı

1. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler %10 FBS içeren DMEM besiyeri içinde 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Kontrol olarak, bakteri ko-kültürü yapılmamış hücre hatları kullanılmıştır.
3. İnkübasyon süresi sonunda uygulama çözeltileri atılarak her bir kuyucuğa 5 mg/ml olarak hazırlanan MTT çözeltisinden, 100 µl eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmış hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve çalkalayıcıda 5-10 dk süre ile çalkalanmıştır.
5. Kuyucukların absorbans değerleri 570 nm'de ölçülmüştür.
6. MTT çözeltisinin ışık ile bozunmasını önlemek için deney karanlık ortamda yapılmıştır.
7. Kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiştir. IC<sub>30</sub> ve inhibitör konsantrasyon 50 (IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplanmıştır.
8. Çalışma üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama alınarak hesaplanmıştır.

### Hücre Canlılığının Hesaplanması

Kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, diğer hücrelerin canlılığı kontrole kıyasla % olarak hesap edilmiştir.

### 3.5.5. Mikroskopik İncelemeler

#### Faz Kontrast ve Işık Mikroskopu İncelemesi

Kontrol grubu ve deney grubuna ait hücreler faz kontrast mikroskopunda morfolojik değişiklikler açısından değerlendirilmiş ve LEİCA DFC280 mikroskopunda görüntülenmiştir.

#### Elektron Mikroskobu İncelemeleri

1. Kontrol ve deney gruplarına ait hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp toplandıktan sonra santrifüjlenmiş ve üstündeki süpernatant atıldıktan sonra DPBS ile yıkama yapılmıştır.
2. Pelet halindeki hücreler fosfat tamponu ile iki kez santrifüjlendikten sonra supernatant atılıp pelet halindeki hücreler %2,5 gluteraldehit ile 2 saat oda ısısında fiske edilmiştir.
3. Fiksasyon sonrası gluteraldehitin uzaklaştırılması için hücre peleti 0.1 M fosfat tamponu ile 1200 rpm'de 5 dakika 3 kez santrifüj edilerek yıkanmıştır.
4. İkinci fiksasyon için hücre peleti 0.1M fosfat tamponu içinde %1 osmiyum tetroksit ile oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat inkübe edildi, fosfat tamponu ile 1200 rpm' de 5 dakika 3 kez santrifüj edilerek yıkanmıştır.
5. Elde edilen fikse hücre peleti %2'lik agara gömüldü ve dehidratasyonu sağlamak için yükselen derecelerde alkollerden (sırayla %50, %60, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden) geçirilmiştir.
6. Hücreler propilen oksit içinde iki defa 15 dakika bekletildikten sonra dörtlü plastik karışım Araldite/Epon812 kullanılarak önce alıştırma ardından gömme yapılmıştır. Alıştırma yapılırken hücreler 1 saat 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında 1 saat, 1 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında bir gece, 1 ölçü propilen oksit + 3 ölçü dörtlü plastik karışımında 3 saat, dörtlü plastik karışımında tutulduktan sonra dörtlü plastik karışım ile bloklanarak etüvde 60°C'de 48 saat polimerize edilmiştir.
7. Mikrotomda (Leica RM 2265) alınan 1µm kalınlıktaki kesitler %1 lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi-Azur II karışımında boyanmıştır.

8. Kesitler ışık mikroskop düzeyinde morfolojik değişikliklerin ve TEM'de incelenecek alanın belirlenebilmesi için digital kamera (Leica DC490, Wetzlar-Germany) bağlı ışık mikroskop (Leica DM6000B, Wetzlar-Germany) ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.
9. Elektron mikroskop incelemesi için, ince kesitler (70 nm'lik) ultra-mikrotom (Leica Ultracut R) ile bakır gridler üzerine alındı. Gridler, boyama cihazında (Leica EM AC20) uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra elektron mikroskop (JEOL-JEM 1400, Japonya) ile incelenerek CCD kamera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) ile fotoğraflanmıştır.

### 3.5.6. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

#### Yöntemin Esası

Yöntem esası, floresan olmayan bir prob olan 5-(ve 6-) klorometil-2',7'-diklorodihydrofloresin diasetat (CM-H2DCFDA)'nın canlı hücreler tarafından yeşil-floresans veren 2',7'-diklorofloresin (CM-DCF)'ne dönüştürülmesi ve oluşan floresans şiddetinin ölçülmesi ( $\lambda_{ex}=640$  nm,  $\lambda_{em}=675$  nm) esasına dayanmaktadır (210).

Florometrik hücre içi ROS Kiti, 1 saatlik inkübasyondan sonra canlı hücrelerdeki hücre içi ROS (özellikle süperoksit ve hidroksil radikalleri) düzeylerini tespit etmek için hassas, tek aşamalı bir florometrik analiz sağlamaktadır. ROS, sitoplazma içinde bulunan florojenik bir sensörle reaksiyona girerek mevcut ROS miktarıyla orantılı florometrik bir ürün oluşturur.

#### Yöntemin Uygulanışı

1. Bütün reaktifler deneye başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir. 500X ROS tayin reaktif çözeltisi 1 ml ROS tayin reaktifi ile 40  $\mu$ l DMSO karıştırılarak hazırlanmıştır.
2. 96 kuyucuklu siyah hücre kültür plağına AGS hücre örnekleri 90  $\mu$ l DMEM içinde olacak şekilde eklenmiştir. IC<sub>30</sub> konsantrasyonları olarak belirlediğimiz Nu7441+MOI142 ve Nu7441+MOI94 bakteri grubu içeren hücrelerden kuyucuklara 10  $\mu$ l eklenmiştir.

3. Kontrol gruplarına 90 µl Nu7441<sup>+</sup>AGS ve Nu7441<sup>-</sup>AGS ve 10 µl DMEM eklenmiştir.
4. Hücre kültür plağı 37°C deki inkübatörde 2 saat boyunca bekletilmiştir.
5. 20 µl 500X ROS tayin reaktifi ve 10 µl deney tamponu içeren master reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.
6. 100 µl/kuyucuk olacak şekilde master reaksiyon karışımı eklenmiştir.
7. Hücre kültür plağı 3 saat 37°C de inkübatörde bekletilmiştir.
8. Kuyucukların floresansı ( $\lambda_{ex}=640$  nm,  $\lambda_{em}=675$  nm) de ölçülmüştür.

### **ROS Düzeylerinin Hesaplanması**

Kontrol hücrelerinin ürettiği hücre içi ROS miktarı %100 kabul edilerek, diğer hücrelerin ürettiği ROS miktarı kontrole kıyasla % olarak hesaplanmıştır.

### **3.5.7. Protein Miktarının Belirlenmesi**

#### **Yöntemin Esası**

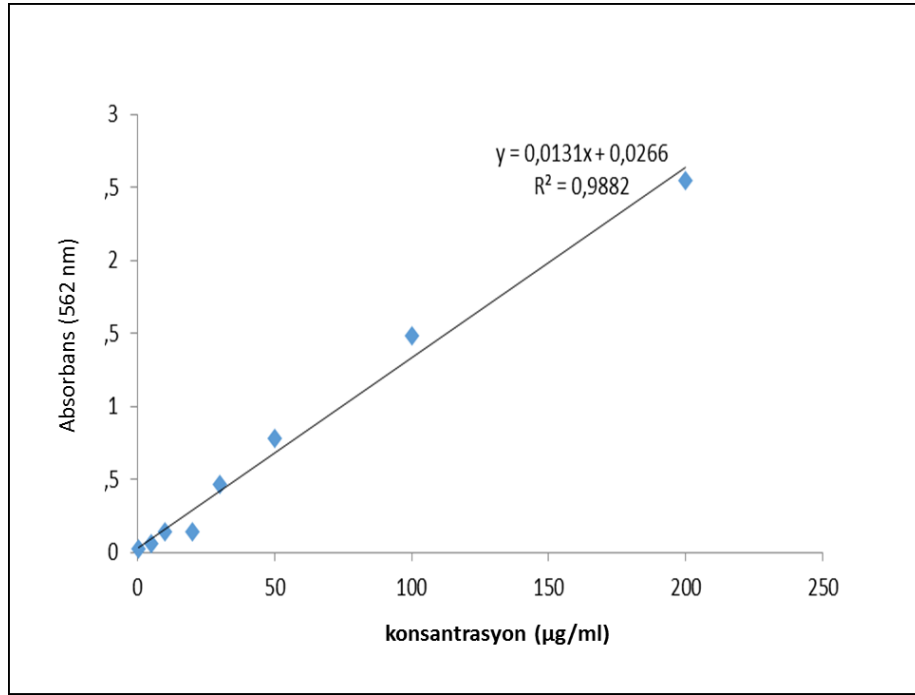
Bişinkonik asit (BCA) deneyinin esası, alkali koşullar altında  $Cu^{+2}$  -protein kompleksinin oluşumuna, ardından  $Cu^{+2}$ 'nin  $Cu^{+1}$ 'e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılıdır. Sistein, triptofan, sistin, tirozin ve peptid bağlarının  $Cu^{+2}$ 'yi  $Cu^{+1}$ 'e indirgeyebildiği bilinmektedir. BCA, alkali ortamlarda  $Cu^{+1}$  ile mavi-mor renkli kompleks oluşturmakta ve böylece proteinler ile alkali  $Cu^{+2}$  indirgenmesi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

#### **Yöntemin Uygulanışı**

1. Hücre lizatları 1/50 oranında seyreltilmiştir.
2. Kuyucuklara BCA standartları, kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOI142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOI94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından 150 µl eklenmiştir.
3. 7 ml QA tamponu, 7 ml QB tamponu ve 280 µl bakır (II) Sülfat içeren çalışma çözeltisi hazırlanmış ve bu çalışma çözeltisi (150 µl) kuyucuklara eklenmiştir.
4. Plak, çalkalayıcıda 15 dakika ve takiben etüvde (37°C) 2 saat inkübe edilmiştir.
5. Örneklerin absorbans değerleri 562 nm'de ölçülmüştür.

### Protein Miktarının Hesaplanması

Protein standartlarının konsantrasyonları ve deney sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile standart eğrisi (Şekil 3.2.) oluşturulmuş, protein miktarları hesaplanmış ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak örnekte protein miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Protein Standart Eğrisi.

#### 3.5.8. AGS Hücrelerinin Lizisi ve Fraksiyonlanması

1. Konfluent hale gelmiş flasklara IC<sub>30</sub> dozlarında bakteri konsantrasyonları uygulanarak 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.
2. 24 saat sonunda besiyeri çekilip 2 kez DPBS ile yıkanmıştır.
3. Yıkama işleminden sonra, flasklara tripsin-EDTA eklenmiş hücrelerin tutundukları yerden ayrılması sağlanmış ve ardından besiyeri eklenmiştir.
4. 1200 devir/dak hızda santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücre pelleti elde edilmiştir.
5. Liziz etme işlemi için hücre liziz tampon çözeltisi ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılmıştır. 100 ml liziz tampon çözeltisi içerisinde 1 ml proteaz inhibitörü

içerecek şekilde proteaz inhibitör kokteyli hazırlanmıştır. Proteaz inhibitörü -20°C'de, liziz tampon çözeltisi ise 4°C'de saklanmıştır.

6. Her bir hücre grubuna 800 µl liziz tamponu eklenmiş, takiben hücre süspansiyonları iki gruba ayrılmıştır. İlk grup 3500 devir/dak hızda 15 dakika, ikinci grup 13000 devir/dak hızda 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar toplanarak -80°C'de saklanmıştır.

### **3.5.9. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Ölçümü**

#### **Yöntemin Esası**

Yöntem, hidroperoksinin GPx ile indirgenmesi sonucu oluşan okside GSSG, GR ve NADPH ile indirgenmiş duruma geri döndürmesi; NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ye oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen azalmanın 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bir ünite GPx, dakikada 1 nmol NADPH'ı NADP'ye dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

#### **Yöntemin Uygulanışı**

1. Enzimatik olmayan kuyucuklar (3 kuyucuk): 120 µl deney tamponu ve 50 µl ko-substrat karışımı eklenmiştir.
2. Pozitif kontrol kuyucukları (3 kuyucuk): 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve 20 µl dilüe edilmiş GPx (kontrol) eklenmiştir.
3. Örnek kuyucukları: 100 µl deney tamponu, 50 µl ko-substrat ve kontrol, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren hücre lizatlarından 20 µl belirlenen kuyucuklara eklenmiştir.
4. Kullanılan bütün kuyucuklara 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Hücre kültür plağı birkaç saniye çalkalanarak reaktifin karışması sağlanmıştır.
5. En az 5 zaman noktası elde etmek koşulu ile spektrofotometre aracılığıyla 340 nm'de dakikada bir kez olmak üzere 5 dakika boyunca absorbanstaki azalma ölçülmüştür.

### Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesinin Hesaplanması

Dakika başına absorbans değışiklikleri ( $\Delta A_{340}$ ) hesaplanarak, absorbans değerleri zamanın bir fonksiyonu olacak şekilde grafik çizdirilmiştir.

Enzimatik olmayan örneklerin dakika başına absorbans değerleri ile örneklerin absorbans değerleri arasındaki fark bulunmuştur. Aşağıdaki formül kullanılarak GPx aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{GPx aktivitesi (nmol/min/ml)} = (\Delta A_{340}/0,00373 * \mu/M^{-1}) \times \text{Dilüsyon faktörü} \\ * \text{NADPH ekstinksiyon katsayısı}$$

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = V_{\text{final}} / V_{\text{örnek}} \times d_{\text{örnek}}$$

$V_{\text{final}}$ : Kuyucuğun nihai hacmi (0,19 ml)

$V_{\text{örnek}}$ : Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,02 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (1)

Spesifik Enzim Aktivitesi (nmol/min/mg protein) = GPx aktivitesi/protein (mg/ml).

### 3.5.10. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

#### Yöntemin Esası

Yöntem, hidrojen peroksit substratının CAT ile enzimatik olarak tepkimeye girmesi sonucunda oluşan formaldehitin, kromojen (4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol; purpald) ile renkli bir bileşik oluşturması ve oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak 540 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. 1 ünite enzim 25°C'de, 1 dakikada 1 nmol formaldehit oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

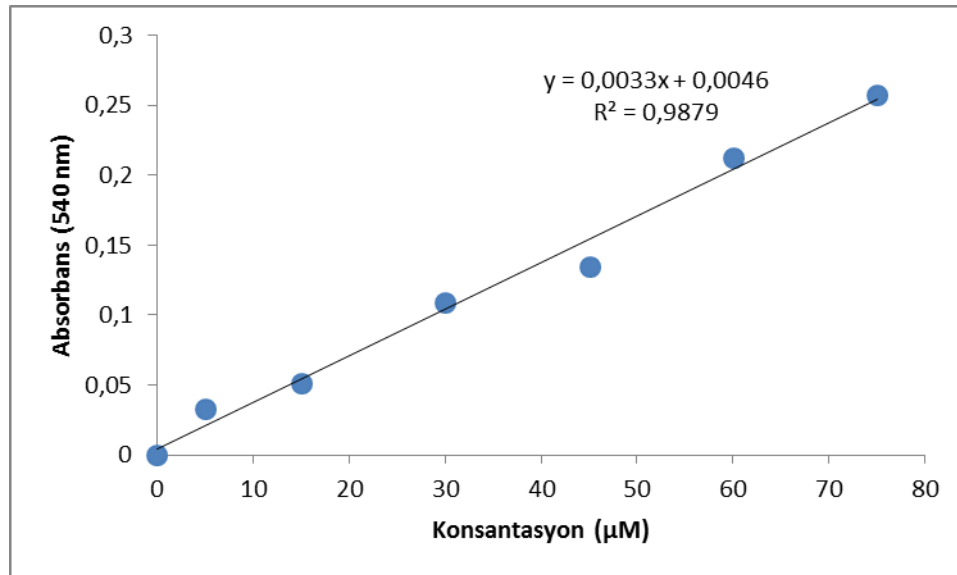
#### Yöntemin Uygulanışı

1. 100  $\mu$ l seyreltilmiş deney tamponu, 30  $\mu$ l metanol ve 20  $\mu$ l formaldehit standardı veya kontrol, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren hücre lizatlarından ilgili kuyucuklara eklenmiştir.
2. Tüm kuyucuklara 20  $\mu$ l seyreltilmiş hidrojen peroksit, reaksiyonun başlama zamanına dikkat edilerek hızlı bir şekilde eklenmiştir.
3. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 20 dakika inkübe edilmiştir.

4. Tüm kuyucuklara reaksiyonu sonlandırmak üzere 30 µl potasyum hidroksit eklenmiş, ardından 30 µl katalaz purpald eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Kullanılan bütün kuyucuklara 10 µl potasyum periyodat eklenmiş, hücre kültür plağı, oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. Örneklerin absorbans değerleri 540 nm'de ölçülmüştür.

### Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması

Formaldehit standartlarının konsantrasyonları ve deney sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (Şekil 3.3) formaldehit konsantrasyonları (µM) hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Katalaz Aktivitesi Standart Eğrisi.

Katalaz aktivitesi hesaplanırken formaldehit konsantrasyonu, tepkimenin izlenme süresi ve dilüsyon faktörü kullanılmış; protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite belirlenmiştir.

$$\text{CAT Aktivitesi (nmol/dk/ml)} = \text{Formaldehit (µM)} / 20 \text{ dk} \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = V_{\text{final}} / V_{\text{örnek}} \times d_{\text{örnek}}$$

$$V_{\text{final}} = \text{Kuyucuğun nihai hacmi (0,17 ml)}$$



$V_{\text{örnek}} = \text{Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,02 ml)}$

$d_{\text{örnek}} = \text{örnek dilüsyonu (9)}$

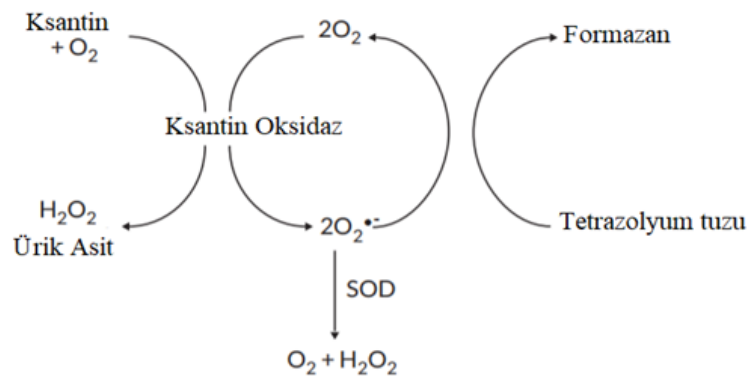
$\text{Spesifik Aktivite (nmol/mg protein)} = \text{Aktivite (nmol/dk/ml)/mg protein/ml}$

### 3.5.11. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

#### Yöntemin Esası

Süperoksit dismutaz kiti, hipoksantin ve ksantin oksidaz ile üretilen süperoksit radikallerini tespit etmek için tetrazolyum tuzu kullanılır ve üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve FeSOD) ölçülebilmektedir.

Total SOD aktivitesi ölçüm yöntemi, ksantin oksidazın ksantini ürik aside dönüştürürken oluşturduğu  $O_2^-$  iyonunun SOD ile dismutasyonu esnasında ortama eklenen WST-1 formazan (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) maddesinin WST1'ye dönüşmesinin ölçülmesinde ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrik bir yöntemle 460 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Süperoksit Dismutaz Ölçümü Reaksiyon Şeması.

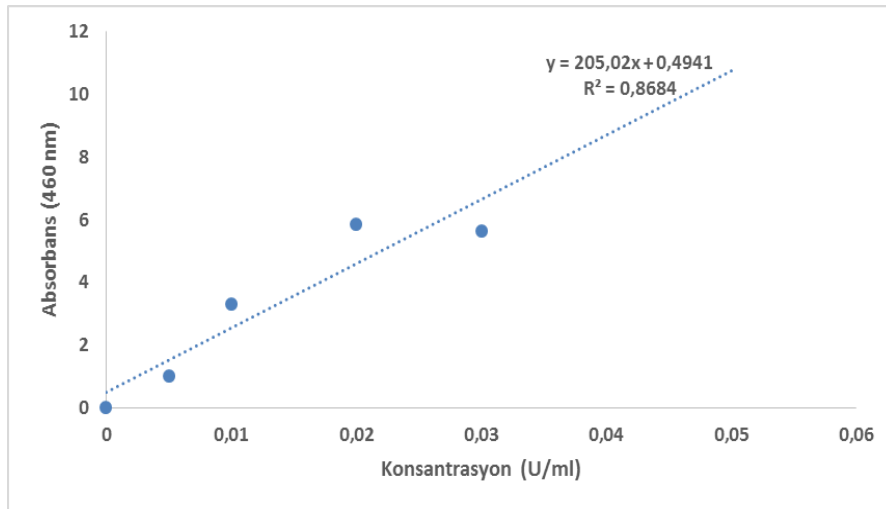
#### Yöntemin Uygulanışı:

1. Kuyucuklara 200  $\mu\text{l}$  dilüe edilmiş radikal detektörü ve belirli kuyucuklara 10  $\mu\text{l}$  SOD standartı veya kontrol, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup>MOİ94 bakteri grubu içeren hücre lizatlarından eklenmiştir.

2. Ksantin oksidaz (20 µl) eklenerek reaksiyon başlatılmış, birkaç saniye hücre kültür plağı çalkalanmıştır.
3. Hücre kültür plağı, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. Örneklerin absorbans değerleri 460 nm’de ölçülmüştür.

### Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması

Kör, standart ve tüm örneklere ait ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Köre ait absorbans değerinin kendisine ve standartların absorbans değerlerine bölünmesi ile elde edilen oran, standartların SOD aktivitesine karşı grafiğe geçilerek “standart eğri” elde edilmiştir (Şekil 3.5.). Standart eğriden hareketle, örneklerin SOD aktiviteleri belirlenmiştir. Dilüsyon faktörü ve protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite (U/mg protein) hesaplanmıştır. Süperoksit radikallerinin %50’sininin dismutasyonu için gerekli olan enzim miktarı bir ünite olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.5. Süperoksit Dismutaz Standart Eğrisi.

Spesifik Aktivite (U/mg protein) = SOD (U/ml)/ protein (mg/ml) x Dilüsyon faktörü

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = V_{\text{final}} / V_{\text{örnek}} \times d_{\text{örnek}}$$

$V_{\text{final}}$ : Kuyucuğun nihai hacmi (0,23 ml)

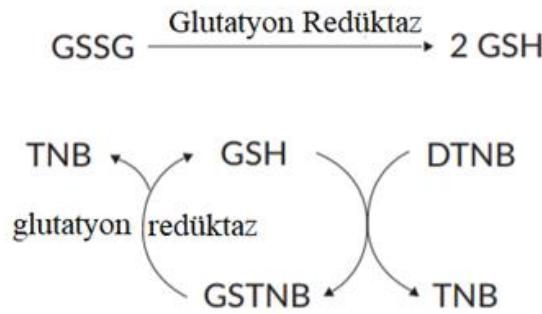
$V_{\text{örnek}}$ : Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (0,01 ml)

$d_{\text{örnek}}$ = örnek dilüsyonu (1).

### 3.5.12. Total Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

#### Yöntemin Esası

Yöntem, DTNB'nin GR ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşmesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Üretilen disülfür GS-TNB (GSH ve TNB arasında), GSH'yi geri dönüştürmek ve daha fazla TNB üretmek amacıyla GR tarafından indirgenmektedir (Şekil 3.6). Üretilen TNB oranı doğrudan bu geri dönüşüm reaksiyonu ve dolayısıyla örnekteki GSH konsantrasyonu ile orantılıdır. TNB'nin absorpsiyonunun 414 nm'de ölçülmesi ile örnekteki GSH düzeyi belirlenebilmektedir.



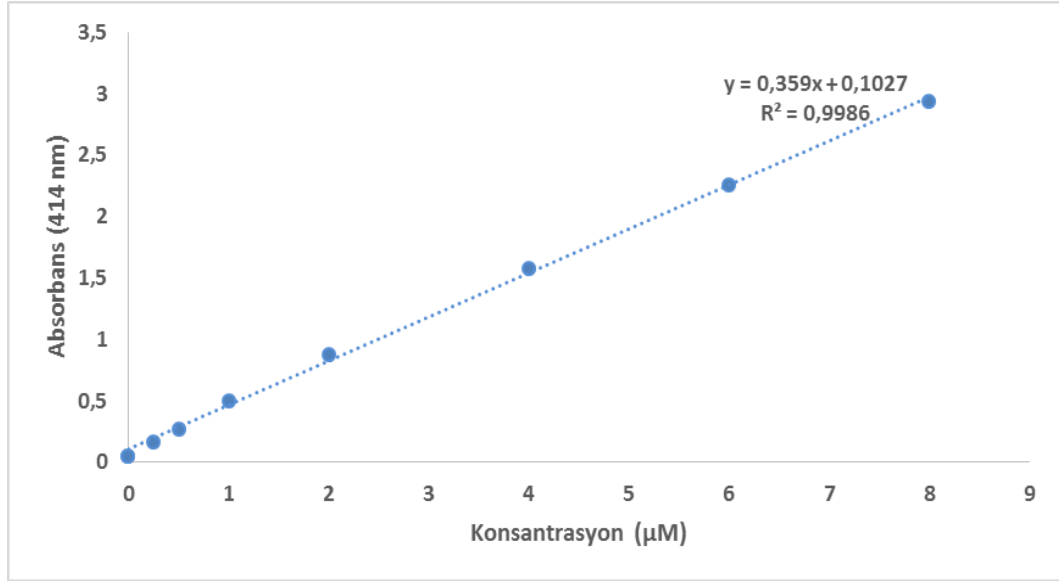
Şekil 3.6. GSH döngüsü.

#### Yöntemin Uygulanışı

1. Kuyucuklara 50 µl GSSG standart çözeltisi eklenmiştir.
2. Kuyucuklara kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından 50 µl eklenmiştir.
3. Deney kokteyli, 20 ml'lik vialde, MES tamponu (11,25 ml), ko-faktör karışımı (0,45 ml), enzim karışımı (2,1 ml), distile su (2,3 ml) ve DTNB (0,45 ml) karıştırılarak hazırlanmıştır.
4. Kuyucuklara taze olarak hazırlanmış deney kokteylinde 150 µl eklenmiştir.
5. Hücre kültür plağı çalkalayıcıda ışıktan korunarak 25 dakika inkübe edilmiştir.
6. Örneklerin absorpsiyon değerleri 414 nm'de ölçülmüştür.

### Total Glutasyon Düzeylerinin Hesaplanması

GSSG standartlarının konsantrasyonlarına karşı standartlara ait absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (Şekil 3.7) örneklerdeki total GSH konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.7. GSH Standart Eğrisi.

### 3.5.13. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

#### Yöntemin Esası

Yöntem, antioksidanlar tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikallerinin azaltılarak daha açık renkli ABTS formuna dönüşmesiyle verdiği absorbansın 660 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır.

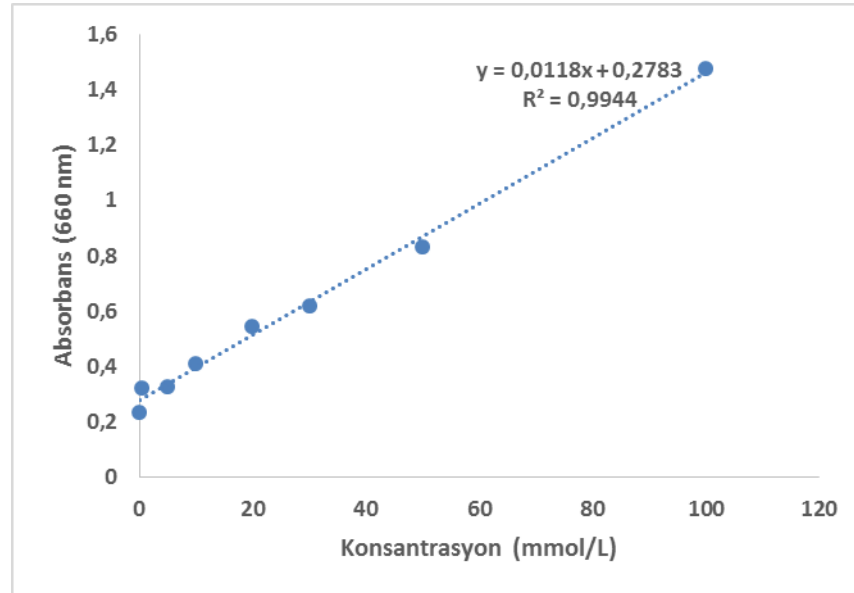
#### Yöntemin Uygulanışı

1. Kuyucuklara 18 µl TAOC standardı, kontrol, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren hücre lizatlarından eklenmiştir.

2. Her bir kuyucuğa 300 µl reaktif 1 çözeltisinden eklenerek karıştırıcıda birkaç dakika karıştırılmış ve hücre kültür plağı, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
3. Örneklerin ilk absorbans değerleri (A1) 660 nm'de ölçülmüştür.
4. Örnekler 45 µl reaktif 2 çözeltisinden eklenerek karıştırıcıda birkaç dakika karıştırılmış ve hücre kültür plağı, 37 °C de 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. Örneklerin ikinci absorbans değerleri (A2) 660 nm'de ölçülmüştür.

### Total Antioksidan Kapasitenin Hesaplanması

Kör, standart ve tüm örnekler için ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. Köre ait absorbans değerinden örnekler için absorbans değerlerinin çıkarılarak yine köre ait absorbans değerinden standartlara ait absorbans değerlerinin çıkarılması ile elde edilen değere bölünmesi ile elde edilen oranlar grafiğe geçilerek “standart eğri” elde edilmiştir. Standartlar için sonuçlar mmol/ mL cinsinden verilmiştir; örnekler için sonuçlar mmol/mg protein olarak verilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Total Antioksidan Kapasite Standart Eğrisi

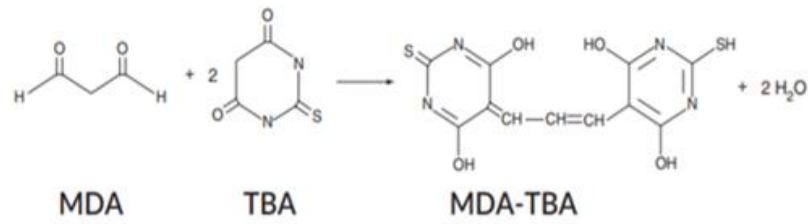
$$A2-A1 = \lambda \text{Abs (Standart/Örnek/Kör)}$$

$$\text{TAOC} = \lambda \text{Abs H}_2\text{O} - \lambda \text{Abs örnek} / \lambda \text{Abs H}_2\text{O} - \lambda \text{Abs standart}$$

### 3.5.14. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

#### Yöntemin Esası

Malondialdehit, lipit peroksidasyonunun doğal olarak meydana gelen ürünüdür. Yöntem, malondialdehit ve tiyobarbitürik asidin yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA kompleksinin kolorimetrik veya florometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. MDA-TBA kompleksinin oluşumu.

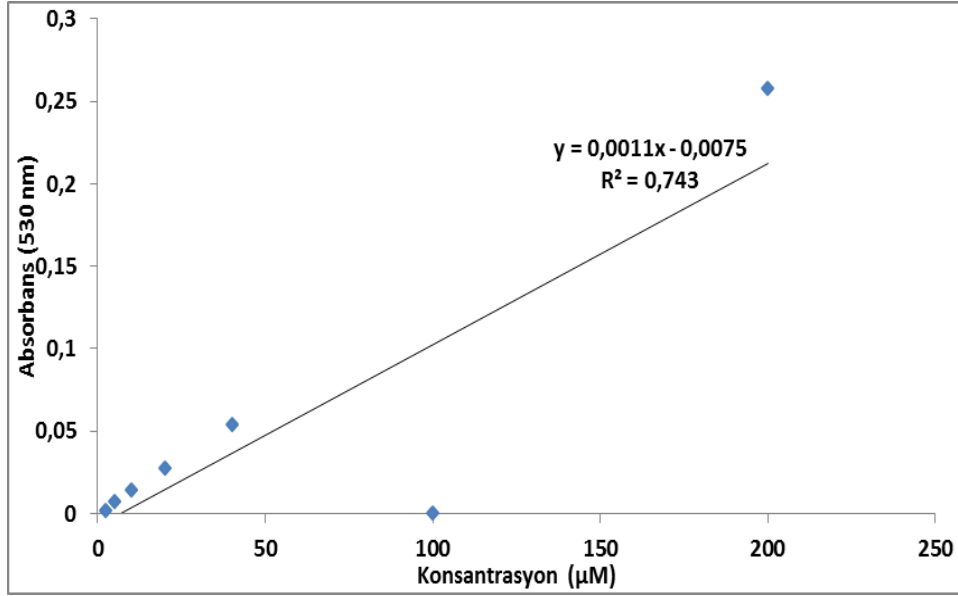
#### Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl seyreltilmiş standart çözeltisi veya hücre lizatları 5ml'lik cam tüplere eklenmiş ve her tüpe 100 µl SDS çözeltisi eklenerek hızlıca karıştırılmıştır.
2. Her cam tüpe 4 ml renk reaktifi eklenerek karıştırılmıştır.
3. Tüpler su banyosunda (100°C) bir saat boyunca bekletilmiştir. Bir saat sonunda cam tüpler kaynayan sudan hızlıca alınarak buzda 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
4. Tüpler 3500 devir/dak 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
5. Tüplerden 150 µl alınarak hücre kültür plağına eklenmiştir.
6. Örneklerin absorbans değerleri 530 nm'de ölçülmüştür.

#### MDA Düzeylerinin Hesaplanması

Her standart ve örneğin ortalama absorbans değerleri hesaplanmıştır. 0 µM standardı kendi absorbans değerinden ve diğer absorbans değerlerinden (standartlar) çıkartılarak doğru absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu değerler MDA

konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak çizdirilmiş, standart eğri (Şekil 3.10.) elde edilmiş, MDA düzeyleri  $\mu\text{M}$  cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.10. MDA Standart Eğrisi.

### 3.5.15. Karbonil Grubu Düzeylerinin Ölçümü

#### Yöntemin Esası

Protein oksidasyonunun en genel göstergesi protein karbonilleridir.  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  gibi redoks döngüsü katyonları, proteinler üzerindeki katyon bağlama bölgelerine bağlanmakta ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  veya  $\text{O}_2$ 'nin yardımı ile birkaç aminoasidin yan zincir amin gruplarını karbonillere dönüştürülmektedir. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ve protein karbonilleri arasındaki reaksiyon sonucu spektrofotometrik olarak analiz edilebilen hidrazon oluşmaktadır.

#### Yöntemin Uygulanışı

1. 200  $\mu\text{l}$  kontrol AGS lizati veya 200 $\mu\text{l}$  Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup>MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizati hazırlanmıştır.

2. Örnek gruplarına 800 µl DNPH, kontrol gruplarına ise 800 µl HCl (2,5 M) eklenmiştir.
3. Örnek ve kontrol grupları oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince, her 15 dakikada bir örnek ve kontrol tüplerine vorteks uygulanmıştır.
4. Tüplere %20'lik TCA (1 ml) eklenmiş, tüpler vortekslenmiş ve buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir.
6. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml TCA (%10) ile süspand edilmiştir. Takiben tüpler buzda 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir.
8. Tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1 ml (1:1) etanol/etil asetat karışımı ile süspand edilmiştir. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kere daha tekrarlanmıştır.
9. Protein pelletleri 500 µl guanidin hidroklorit ile süspand edilmiştir.
10. Tüpler 15000 devir/dak 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edilmiştir.
11. Örnek ve kontrol tüplerinden 220 µl 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir.
12. Örneklerin absorbans değerleri 360 nm'de ölçülmüştür.

### **Karbonil Düzeylerinin Hesaplanması**

Kontrol gruplarının absorbans değerleri ile örnek gruplarının absorbans değerleri arasındaki fark hesaplanmıştır (CA). Aşağıdaki formül ile karbonil konsantrasyonları nmol/ml cinsinden belirlenmiştir.

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = \frac{(\text{CA})}{(0,011 \mu\text{M}^{-1})} \times (500 \mu\text{l}/200 \mu\text{l})$$

DNPH 370 nm'deki ekstinksiyon katsayısı  $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) dir. Bu değer kuyucuktaki çözeltiliye de bağlı olan yol uzunluğu da hesaba katılarak yeniden hesaplanmıştır.

Daha sonra karbonil düzeyleri nmol/mg cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Karbonil (nmol/mg)} = \frac{[\text{Protein Karbonil (nmol/ml)}]}{\text{protein (mg/ml)}}$$



### 3.5.16. 8-hidroksi-2'deoksiguanin (8-OHdG) Düzeylerinin Belirlenmesi

#### Yöntemin Esası

DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklı doku, serum, plazma, idrar ve hücre lizatında 8-hidroksi-2'deoksiguanin (8-OHdG) oluşumunun ELISA ile ölçümü esasına dayanmaktadır. 8-OHdG, DNA onarımı sırasında üretilmektedir ve ölçümü yaşlanma, kanser ve diğer dejeneratif hastalıklara bağlı oksidatif hasarın göstergesi olarak yararlı olabilir. 8-OHdG Kiti, 8-OHdG monoklonal antikoru ve örnek veya standartların 8-OHdG'lere bağlanma özelliğinden yararlanarak 8-OHdG tayini yapmaktadır. Standart veya örnekteki 8-OHdG'lere bağlanmış antikörlerin yıkanması ile sadece sabit 8-OHdG'ler ortamda kalmaktadır. Sabit 8-OHdG'leri belirlemek için ikinci bir antikor daha eklenmekte, bu antikor ortamda kalan monoklonal antikörlere bağlanmaktadır. Tekrar yıkama işleminden sonra kromojen eklenmesi ortamdaki antikor miktarı oranına göre renk değişimine neden olmaktadır. Renk reaksiyonu sonlandırıldıktan sonra 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmaktadır.

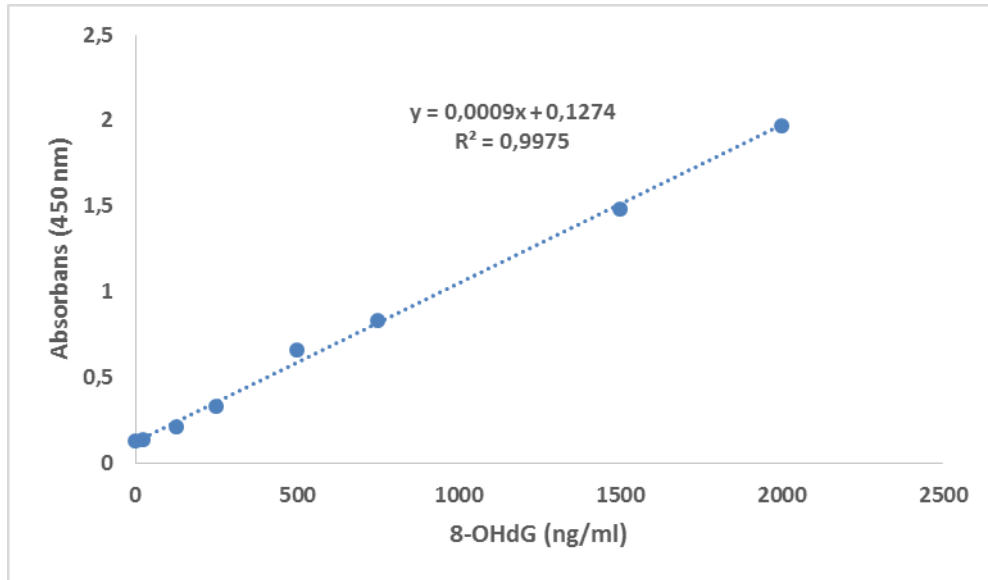
#### Yöntemin Uygulanışı

1. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
2. 100 µl standart çözeltisi veya kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenerek plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. 1/100 oranında seyreltilmiş biotinli antikor çözeltisi tüm kuyucuklara 100 µl olarak eklenmiş ve plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
5. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
6. 1/100 oranında seyreltilmiş enzim konjugatı çözeltisi kör hariç tüm kuyucuklara 100 µl olarak eklenmiş ve plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
7. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.

8. 100 µl renk reaksiyon çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak enyüksek standarttaki renk değişimi temel alarak yaklaşık 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir
9. Kuyucuklara 100 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, 10 dakika içerisinde örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

### 8-OHdG'nin Hesaplanması

8-OHdG'nin, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından log-log algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.11). Standartlar için sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir. Örnekler için hesaplamalar ng/mg protein olarak yapılmıştır.



Şekil 3.11. 8-OHdG Standart Eğrisi.

### 3.5.17. OGG1 (8-Oxoguanin Glikozilaz 1) Düzeylerinin Ölçülmesi

DNA'nın oksidatif hasarlarının tamirinde görevli proteinlerden olan OGG1 oluşumunun ELISA ile ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kullanılan OGG1 kiti, OGG1 monoklonal antikorunun ve örnek veya standartların OGG1'e bağlanma özelliğinden yararlanarak OGG1 tayini yapmaktadır. Standart veya örnekteki OGG1 proteinine bağlanmış antikorların yıkanması ile sadece sabit OGG1 proteinleri ortamda kalmaktadır. Sabit OGG1 proteinlerini belirlemek için ortama ikinci bir antikor daha eklenmekte, bu antikor ortamda kalan monoklonal antikorlara bağlanmaktadır. Tekrar yıkama işleminden sonra kromojen eklenmesi ortamdaki antikor miktarı oranına göre renk değişimi sağlamaktadır. Renk reaksiyonu sonlandırıldıktan sonra 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmaktadır.

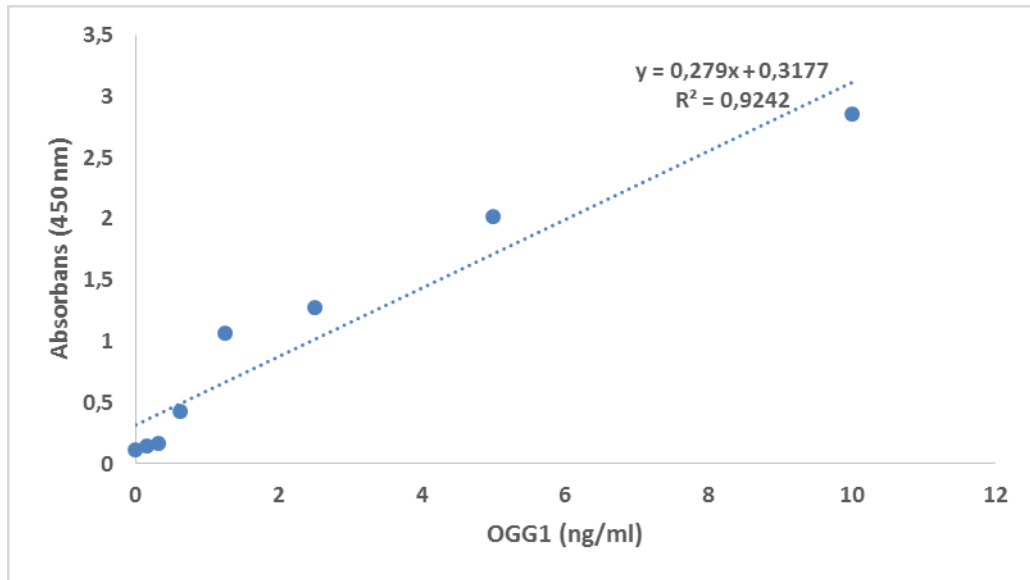
#### Yöntemin Uygulanışı

1. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
2. 100 µl standart çözeltisi veya kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenerek plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 2 kez yıkanmıştır.
4. 1/100 oranında seyreltilmiş biotinli antikor çözeltisi tüm kuyucuklara 100 µl olarak eklenmiş ve plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
5. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
6. 1/100 oranında seyreltilmiş enzim konjugatı çözeltisi kör hariç tüm kuyucuklara 100 µl olarak eklenmiş ve plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
7. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar 250 µl yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
8. 100 µl renk reaksiyon çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş; plak en yüksek standarttaki renk değişimi baz alarak yaklaşık 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.

9. Kuyucuklara 100 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, 10dakika içerisinde örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### OGG1 Hesaplanması

Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından lineer algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.12). Standartlar için sonuçlar ng/ml cinsinden verilmiştir. Örnekler için ise sonuçlar ng/mg protein olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.12. OGG1 Standart Eğrisi.

### 3.5.18. H2AX ve Pan H2AX Düzeylerinin Ölçülmesi

#### Yöntemin Esası

Kit içerisinde yer alan plak anti-fosfo H2AX ve Pan H2AX monoklonal antikoru ile kaplıdır ve antikoru tespit edebilmek için biotin konjuge fosfo-H2AX

antikoru kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir. Durdurma çözeltisi eklenir, asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

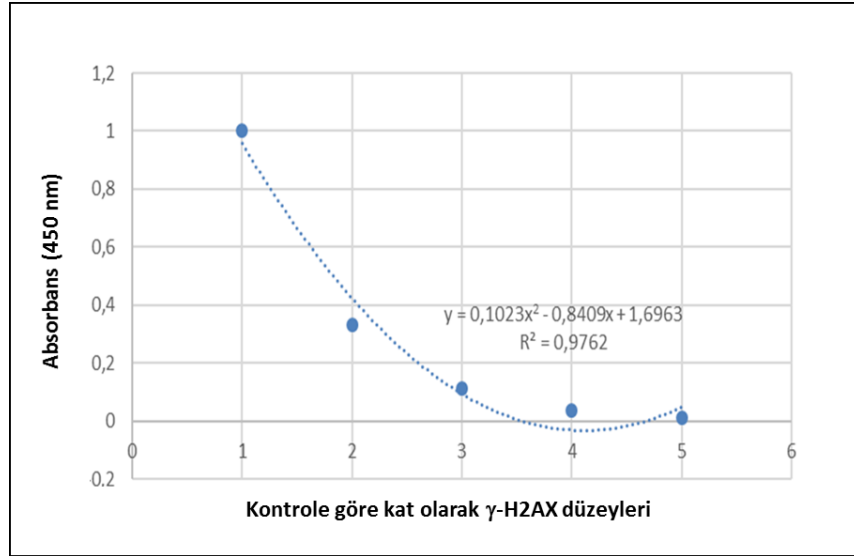
### **Yöntemin Uygulanışı**

1. 100 µl standart çözeltisi kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 2,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklenerek 4 kez yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
5. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklenerek 4 defa yıkanmıştır.
6. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
7. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklenerek 5 kez yıkanmıştır.
9. Kuyucuklara 100 µl TMB substratı eklenmiş ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir.
10. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

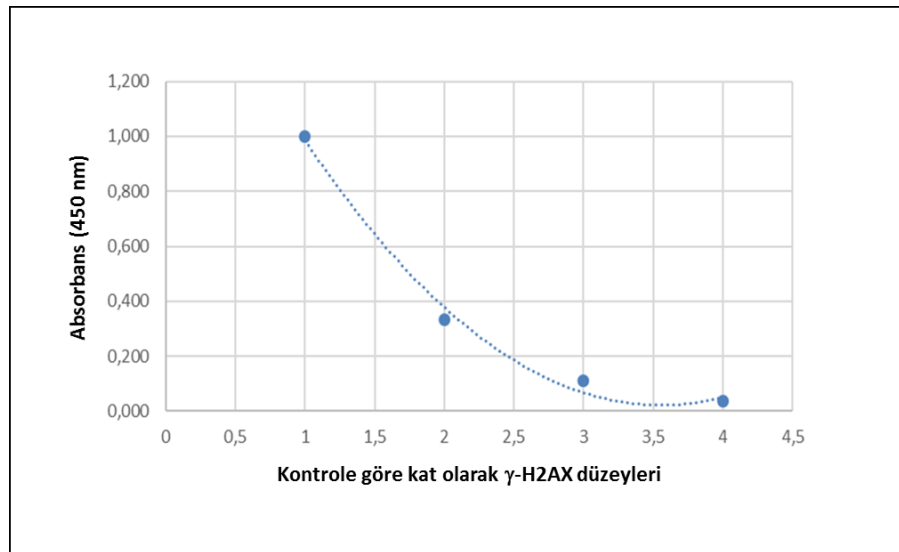
### **H2AX ve Pan H2AX Düzeylerinin Hesaplanması**

Fosfo-H2Ax düzeyleri ve Pan H2AX düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log,

log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak kontrole göre kat olarak hesaplanan standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.13ve Şekil 3.14). Örneklerin hesaplamaları da standartlar kullanılarak yine kontrole göre kat olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.13. H2AX Standart Grafiği.



Şekil 3.14. PanH2AX Standart Grafiği

### 3.5.19. Kaspaz 3 Düzeylerinin Ölçümü

#### Yöntemin Esası

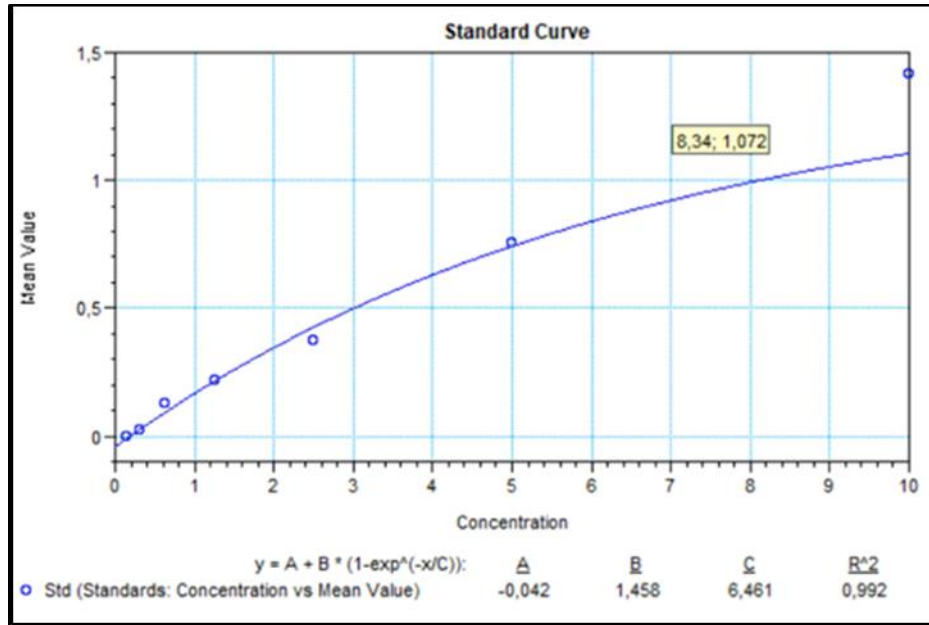
Kit içinde yer alan plak anti-kaspaz 3 monoklonal antikoru ile kaplıdır ve antikoru tespit edebilmek için biyotin konjuge anti-kaspaz 3 antikoru kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir. Durdurma çözeltisi eklenir, asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

#### Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl standart çözeltisi veya kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ 142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından hücre lizatlarından kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### Kaspaz 3 Düzeylerinin Hesaplanması

Kaspaz 3 düzeyleri, Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir. Sonuçlar ng/mL cinsinden verilmiştir (Şekil. 3.15.).



Şekil 3.15. Kaspaz 3 Standart Eğrisi. (ng/ml)

### 3.5.20. Kaspaz 8 Düzeylerinin Ölçümü

#### Yöntemin Esası

Kit içerisinde yer alan plak anti-kaspaz 8 monoklonal antikoru ile kaplıdır ve antikoru tespit edebilmek için biyotin konjuge anti-kaspaz 8 antikoru kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için



TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir. Durdurma çözeltisi eklenir, asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

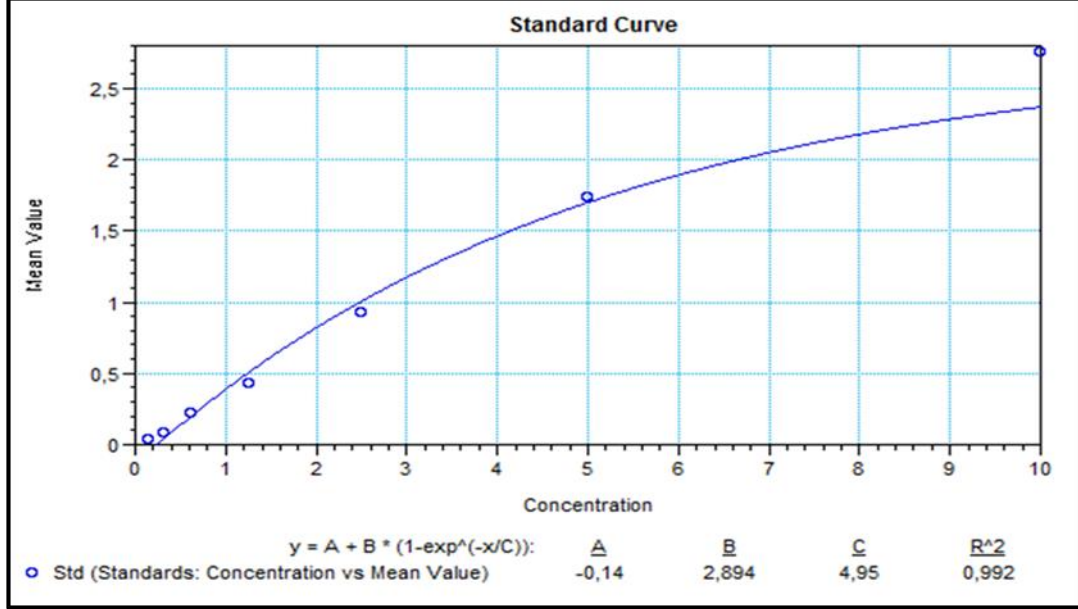
### **Yöntemin Uygulanışı**

1. 100 µl standart çözeltisi kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### **Kaspaz 8 Düzeylerinin Hesaplanması**

Kaspaz 8 düzeyleri, Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı

standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir. Sonuçlar nmol/mL cinsinden verilmiştir (Şekil.3.16.).



Şekil 3.16. Kaspaz 8 Standart Eğrisi. (ng/ml)

### 3.5.21. Beclin-1 (BECN1) Düzeylerinin Ölçümü

#### Yönetimin esası

Kit içerisinde yer alan plak anti-BECN1 monoklonal antikoru ile kaplıdır ve antikoru tespit edebilmek için biyotin konjuge BECN1 antikoru kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir. Durdurma çözeltisi eklenir; bu çözeltideki asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

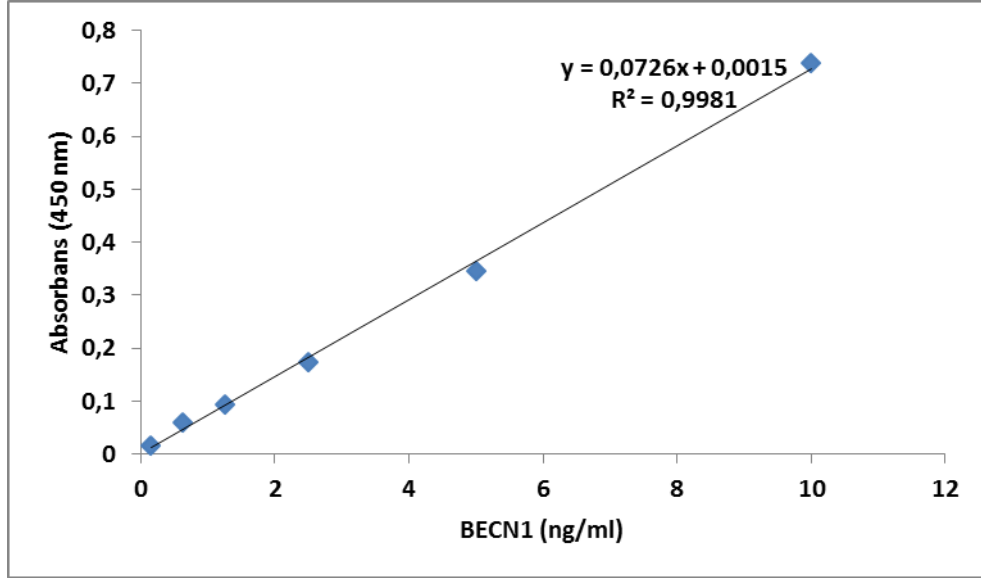
### Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl standart çözeltisi kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 2 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm’de ölçülmüştür.

### BECN1 Düzeylerinin Hesaplanması

Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından lineer algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir. Sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir; örneklerdeki BECN1 konsantrasyonu ng/mg protein olarak hesaplanmıştır (Şekil.3.17).

$$\text{Relatif OD}_{450} = (\text{Kuyucuk OD}_{450}) - (\text{Kör OD}_{450})$$



Şekil 3.17. BECN1 Standart Eğrisi.

### 3.5.22. LC3 Düzeylerinin Ölçümü

#### Yönetimin esası

Kit içerisinde yer alan plak LC3 monoklonal antikoruna ile kaplıdır ve antikoruna tespit edebilmek için biyotin konjuge LC3 antikoruna kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir.

Durdurma çözeltisi eklenir, çözeltideki asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm'de ölçülür.

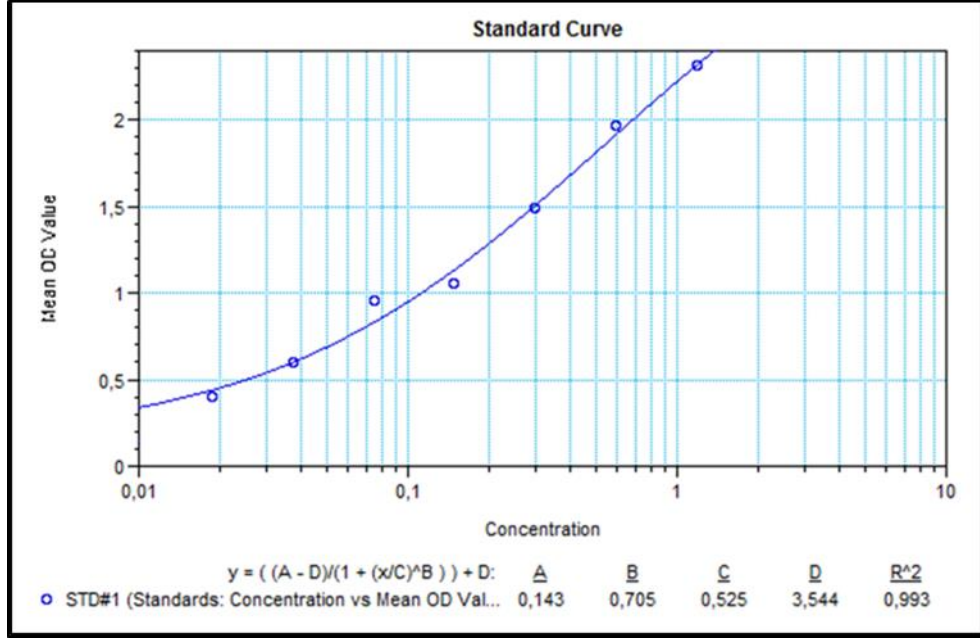
#### Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl standart çözeltisi kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.

4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

### **LC3 Düzeylerinin Hesaplanması**

Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir. Sonuçlar pg/mL olarak verilmiştir (Şekil.3.18).



Şekil 3.18. LC3 Standart Eğrisi (ng/ml)

### 3.5.23. p62 Düzeylerinin Ölçümü

#### Yönetimin esası

Kit içerisinde yer alan plak p62 monoklonal antikoruna ile kaplıdır ve antikorun tespiti edebilmek için biyotin konjuge p62 antikoruna kullanılır. Standartlar, örnekler ve biyotin-işaretli antikor, kuyucuklara eklenir. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklenir. Renklendirme için TMB substrat kullanılır ve TMB, HRP ile katalizlenerek mavi renkte ürün meydana getirir. Durdurma çözeltisi eklenir; çözeltideki asidin etkisi ile renk sarıya dönüşür. Oluşan renk şiddeti 450 nm’de ölçülür.

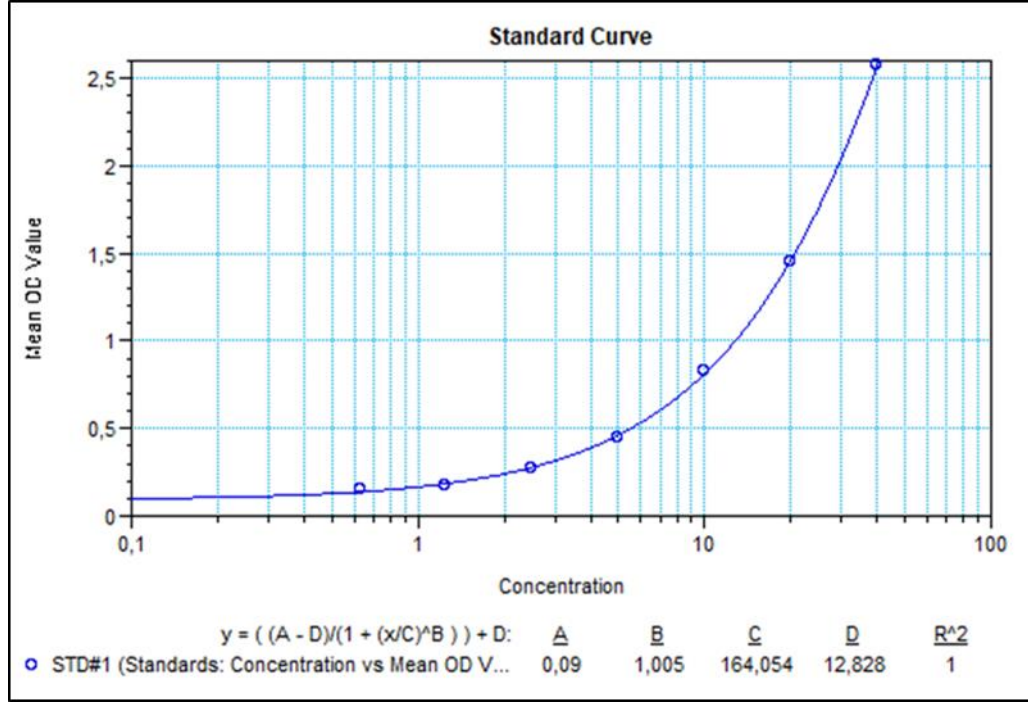
#### Yöntemin Uygulanışı

1. 100 µl standart çözeltisi kontrol AGS, Nu7441<sup>+</sup>MOİ142 bakteri grubu veya Nu7441<sup>-</sup> MOİ94 bakteri grubu içeren AGS hücre lizatlarından kuyucuklara eklenmiştir.
2. Plak 1,5 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.

3. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.
4. Primer antikor, primer antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
5. 100 µl seyreltilmiş primer antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 1 saat boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
6. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır.
7. Sekonder antikor, sekonder antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilmiştir.
8. 100 µl seyreltilmiş sekonder antikor çözeltisi tüm kuyucuklara eklenmiş, plak 30 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
9. Plak içindeki çözeltiler dökülmüş ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır.
10. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı eklenmiş ve 15 dakika boyunca inkübatörde (37°C) bekletilmiştir.
11. Kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş, örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

### **p62 Düzeylerinin Hesaplanması**

Molecular Devices - Softmax® programı kullanılarak hesaplanmıştır. Standart, örnek ve kontrol grupları program için tanımlanmış ve absorbans değerleri girilmiştir. Programda bulunan lineer, semi-log, log-log, kuadratik, 4- parametre (lojistik), log-logit, noktadan noktaya, üstel ve kübik spline eğri algoritmalarından üstel algoritması kullanılarak konsantrasyona karşı standartların ortalaması çizdirilmiş, standart eğri elde edilmiştir. Sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir (Şekil.3.19).



Şekil 3.19. P62 Standart Eğrisi (ng/ml)

### 3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS 17.0 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmış ve gruplar arasındaki fark Student t testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiş,  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksosite Tayini

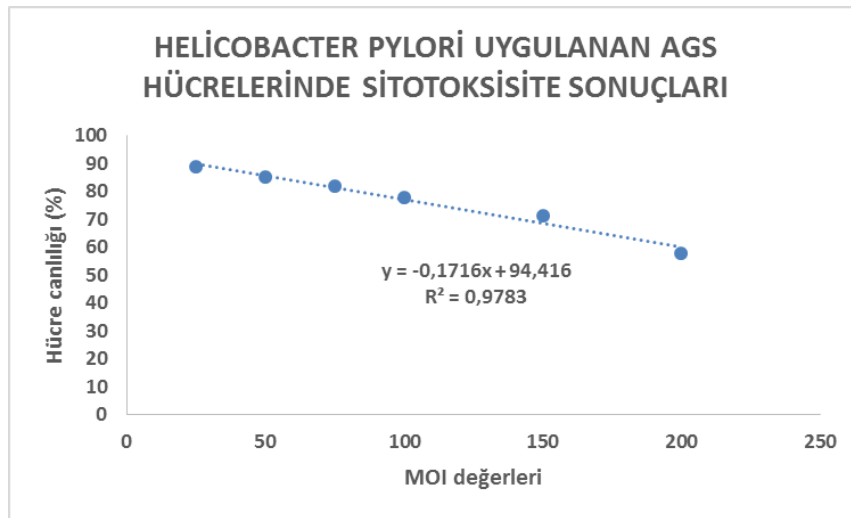
AGS hücreleri *Helicobacter pylori* ile farklı MOİ değerlerinde Nu7441 varlığında ve yokluğunda 24 saat infekte edilmiş ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir. Sitotoksosite değerleri üç farklı günde ve gün içi üç tekrar ile yapılmıştır. Hücre canlılıkları herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre % olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon değerleri (medyan inhibitör konsantrasyon, IC<sub>50</sub>) ve hücre canlılığında %30 inhibisyona neden olan konsantrasyon (inhibitör konsantrasyon 30, IC<sub>30</sub>) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.1; Şekil 4.1.a ve Şekil 4.1.b).

**Tablo 4.1.** Çalışma Gruplarının IC<sub>30</sub> ve IC<sub>50</sub> Değerleri

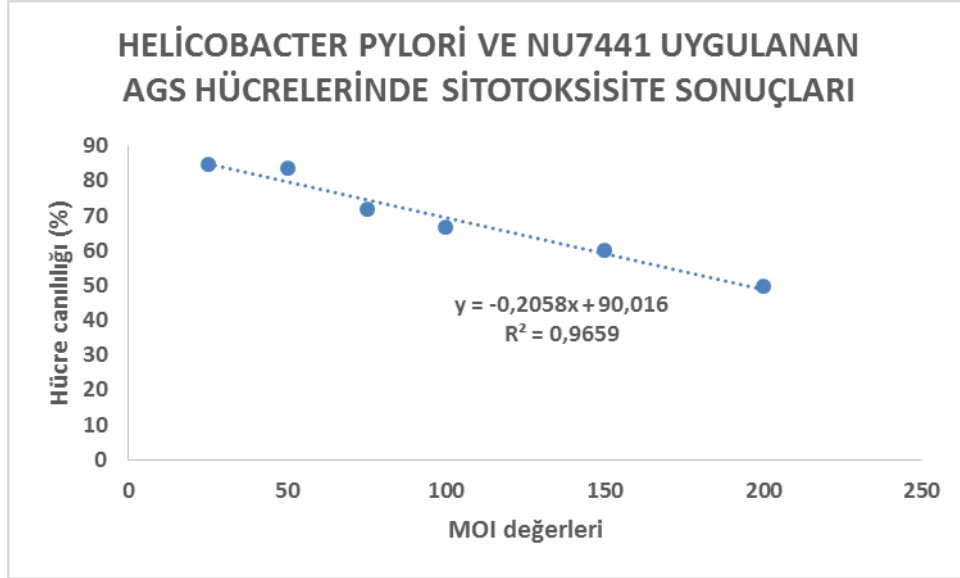
Çalışma Grupları	HP	HP+Nu7441
IC <sub>30</sub>	142,3	97,3
IC <sub>50</sub>	259	194

\* Sonuçlar üç farklı zamanda ve gün içi iki tekrarla yapılan çalışmaların ortalama değerleridir.

IC<sub>30</sub>: inhibitör konsantrasyon; IC<sub>50</sub> medyan inhibitör konsantrasyon.



**Şekil 4.1. a.** AGS hücre canlılığı üzerinde HP'nin (MOİ değerlerinin) etkisi



**Şekil 4.2.b.** AGS hücre canlılığı üzerinde Nu741+HP'nin (MOİ değerlerinin) etkisi

## 4.2. Mikroskopik İncelemeler

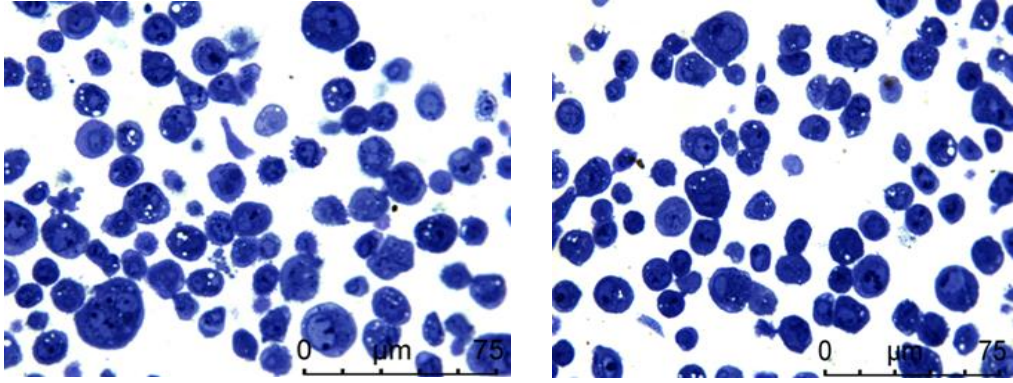
### 4.2.1. Işık mikroskopu İncelemeleri

AGS hücrelerinde belirgin çekirdekçik, ökromatik ve büyük çekirdekler gözlenmiştir. Çekirdek sitoplazma oranı çekirdek lehine bulunmuştur. Hücrelerde yer yer küçük vakuoller gözlenmiştir (Şekil 4.3.).

*Helicobacter pylori* ile inkübe edilen AGS hücrelerinin membranları üzerinde *Helicobacter pylori*'nin flagelları izlenmiştir. Hücrelerin sitoplazmasında vakuoller gözlenmiştir (Şekil 4.4.).

Nu7441 ile inkübe edilen AGS hücrelerinin çekirdeklerinin ve hücre membranının sağlam olduğu; ancak sitoplazmanın çok sayıda vakoulla dolu olduğu ve bu vakuoller ile çekirdeğin kenara itildiği gözlenmiştir (Şekil 4.5.).

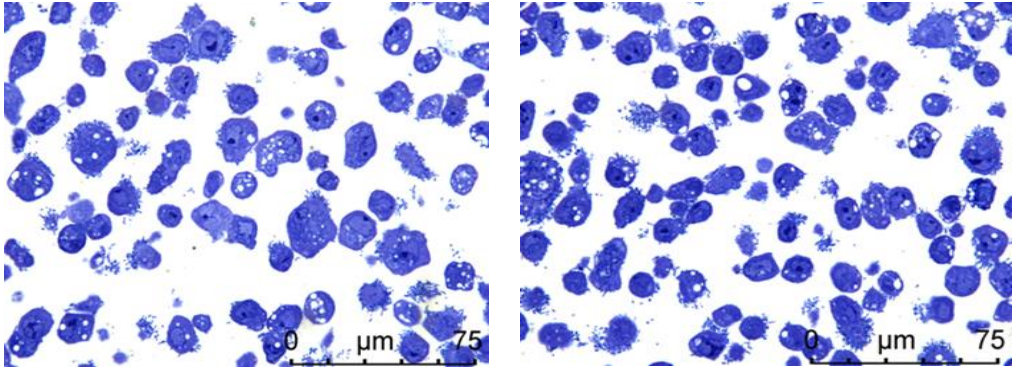
*Helicobacter pylori* ve Nu7441 ile inkübe edilen grupta AGS hücrelerinin membranı çevresinde flagellalar ile çevrede çubuk şekilli *Helicobacter pylori* kesitleri gözlenmiştir. Bu grupta mide adenokarsinom hücre sayısının oldukça azaldığı, var olan hücrelerin sitoplazmasının vakuoller ile dolu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.3.** Kontrol grubu mikrografi

Metilen mavisi-Azur II X630.

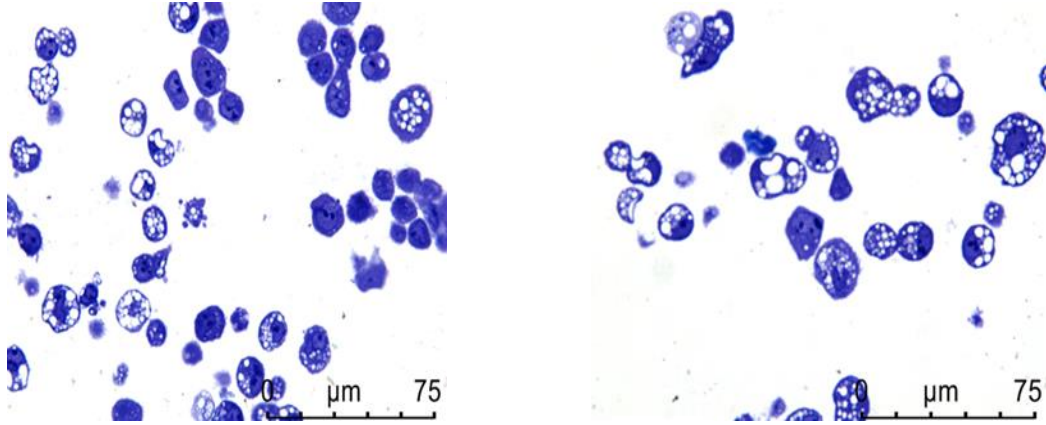
AGS hücreleri belirgin çekirdekçik, ökromatik, büyük çekirdekleri ile gözlenmektedir. Çekirdek sitoplazma oranı çekirdek lehine belirlenmiştir.



**Şekil 4.4.** HP grubu mikrografi

Metilen mavisi-Azur II X630

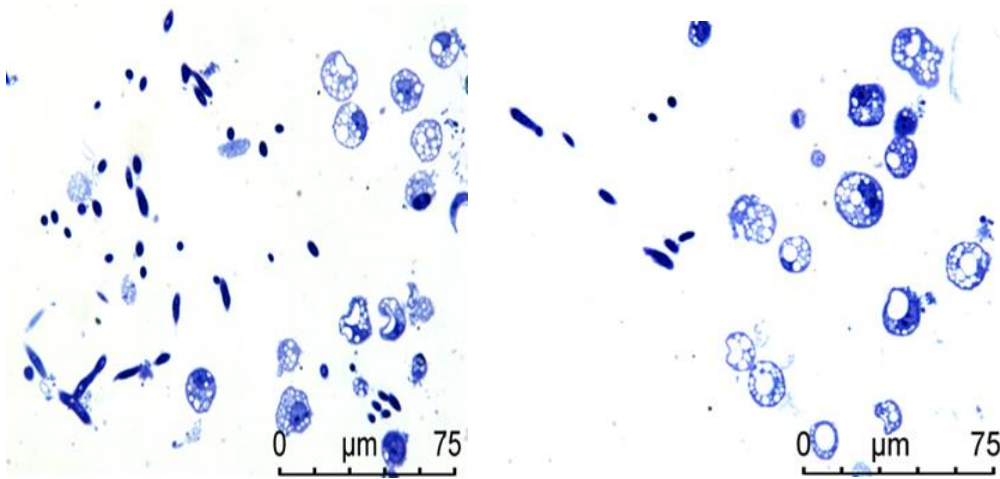
*Helicobacter pylori* ile inkübe edilen AGS hücrelerinin sitoplazmasında vakuoller, hücrelerin çevrelerinde membrana tutunmuş *Helicobacter pylori*'nin flagelları izlenmektedir.



**Şekil 4.5.** Nu7441 grubu mikrografi

Metilen mavisi-Azur II X630

Nu7441 ile inkube edilen AGS hücrelerinde sitoplazmada çok sayıda vakuol ve bu vakuoller ile çekirdeğin kenara itildiği gözlenmektedir.



**Şekil 4.6.** HP + Nu7441 mikrografi

Metilen mavisi-Azur II X630

*Helicobacter pylori* ve Nu7441 ile inkube edilen gruba ait mikrografta çubuk şekilli *Helicobacter pylori* ve AGS hücreleri izlenmektedir. Hücre sayısının oldukça azaldığı var olan hücrelerin sitoplazmasının vakuoller ile dolu olduğu gözlenmektedir.

## 4.2.2. Elektron mikroskopu İncelemeleri

### Kontrol grubu

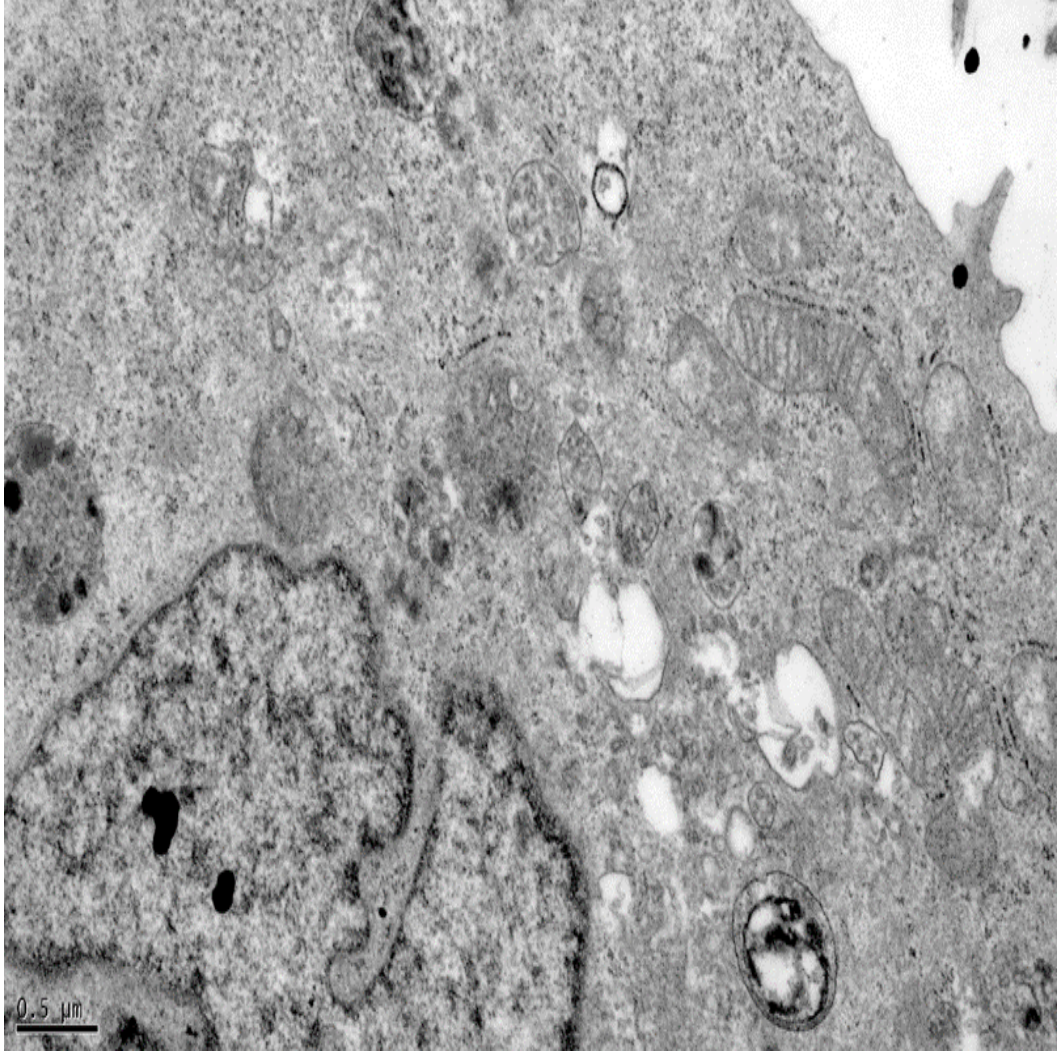
AGS hücrelerinin elektron mikroskop ile incelemesinde hücrelerin küçük mikrovillusları, belirgin çekirdekçik ile girintili çekirdekleri sitoplazmasında granüllü endoplazma retikulumu, mitokondriyonları, glikojen tanecikleri izlenmiştir. Sitoplazmada birkaç fagozom gözlenmiştir (Şekil 4.7., 4.8., 4.9.).



Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranyl asetat-Kurşun sitrat X12 000

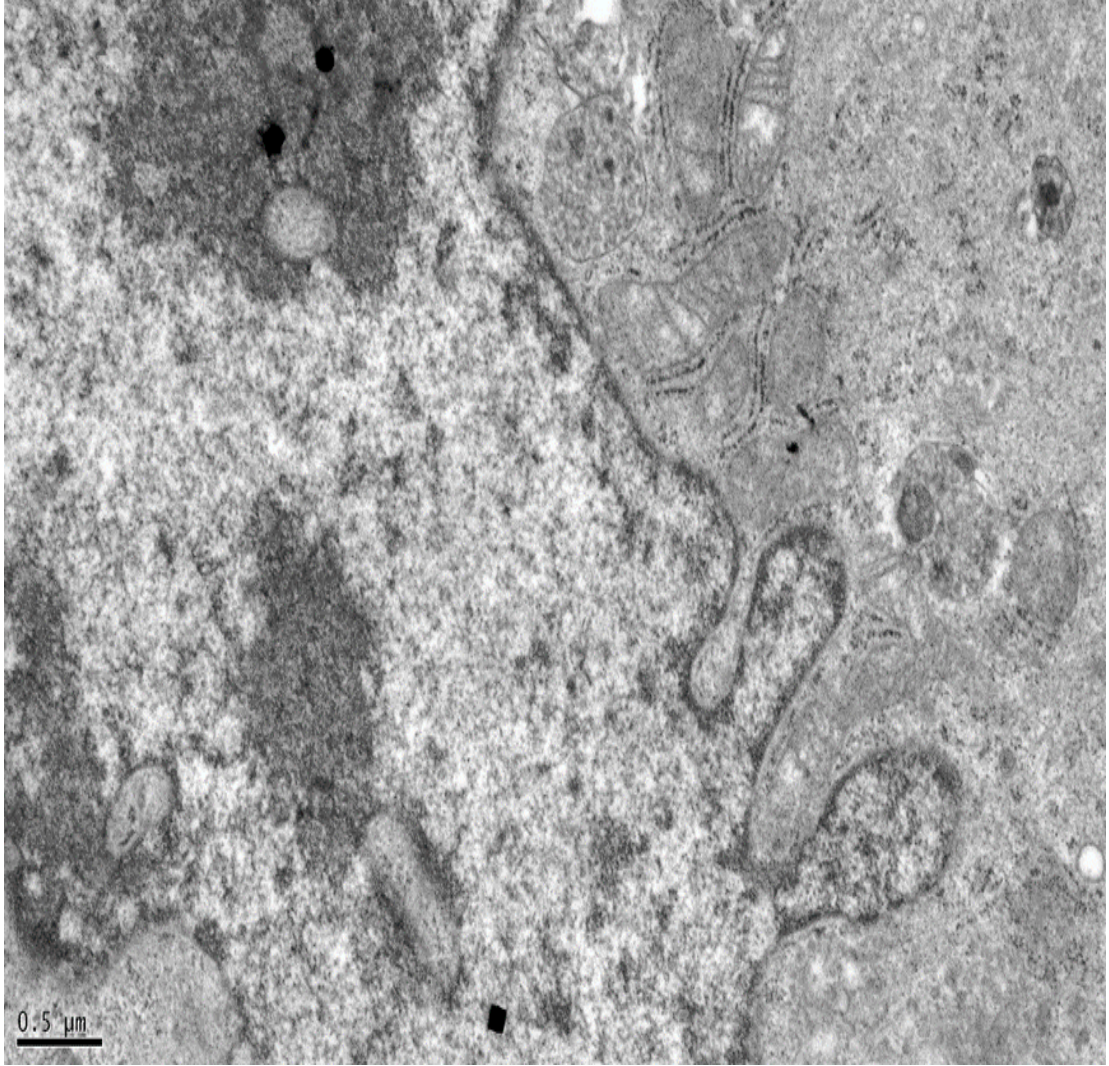
Kontrol grubunda AGS hücrelerinin küçük mikrovillusları, belirgin çekirdekçik ile girintili çekirdekleri izlenmektedir.



**Şekil 4.8.** Kontrol grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranil asetat-Kurşun sitrat X30 000

Kontrol grubunda daha büyük büyütmede sitoplazmada granüllü endoplazma retikulumu, mitokondriyonlar, glikojen tanecikleri ve fagozom gözlenmektedir.



**Şekil 4.9.** Kontrol grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranyl asetat-Kurşun sitrat X30 000

Kontrol grubunda daha büyük büyütmede çekirdekçik, çekirdek, sitoplazmada granüllü endoplazma retikulumu, kristalleri ile mitokondriyonlar izlenmektedir.

### **HP Grubu**

*Helicobacter pylori* ile inkübe edilen grupta AGS hücrelerinin çevresinde hücre membranına tutunmuş çubuk ve kokoid şekilli *Helicobacter pylori* bakterileri izlenmiştir. AGS hücre sitoplazmasında vakuoller ve membran ile çevrili heterojen içeriğe sahip yapılar gözlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Az sayıda *Helicobacter pylori* ile çevrili hücrelerde çekirdek sağlam ancak sitoplazmada vakuoller, çok sayıda

*Helicobacter pylori* ile çevrili olanlarda AGS hücrelerinde çok sayıda vakuol ve karyolizis gözlenmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

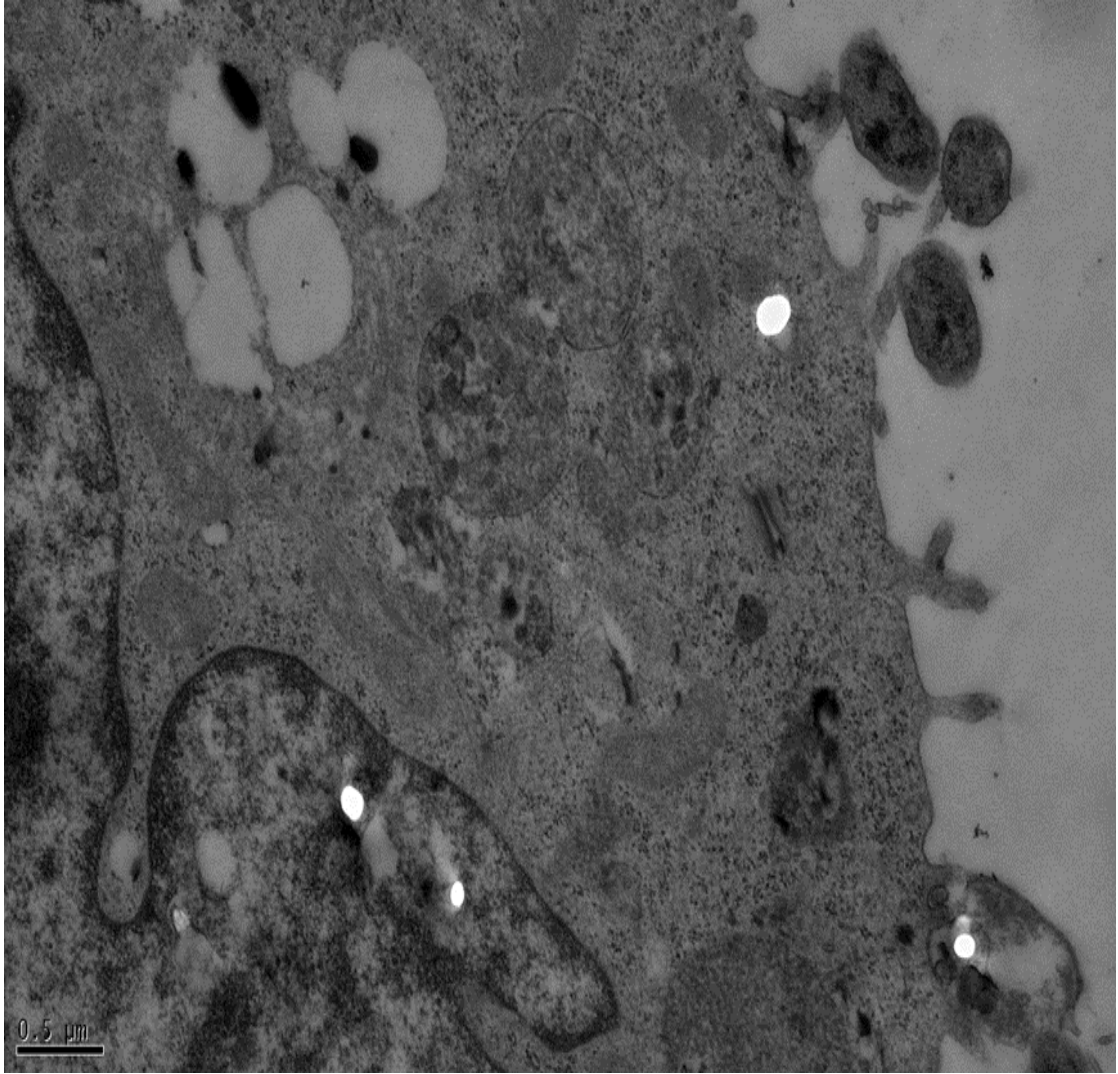


**Şekil 4.10.** *Helicobacter pylori* grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranil asetat-Kurşun sitrat X8 000

*Helicobacter pylori* ile inkübe edilen grupta AGS hücrelerinin çevresinde hücre membranına tutunmuş çubuk ve kokoid şekilli *Helicobacter pylori* kesitleri izlenmektedir. AGS hücre sitoplazmasında vakuoller gözlenmektedir.

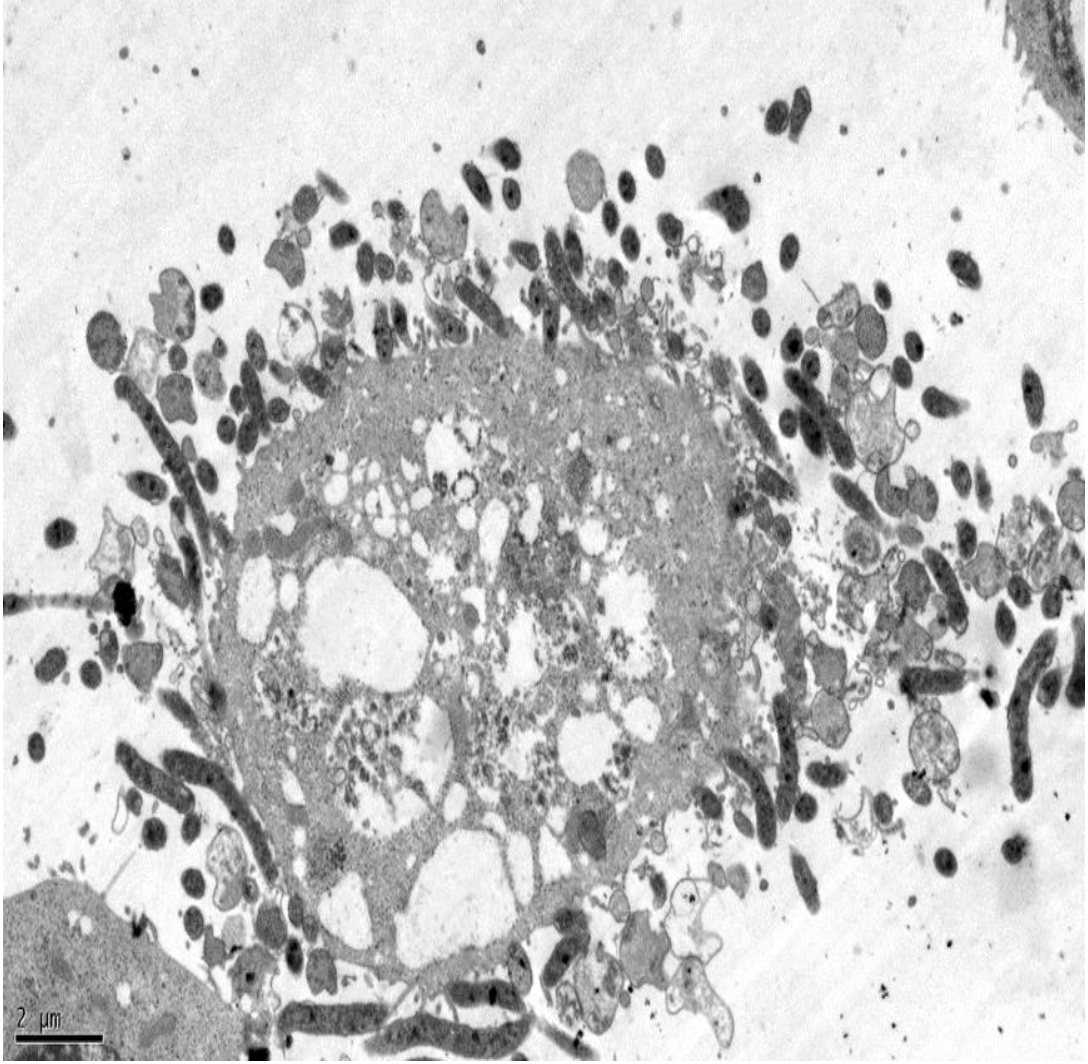




Şekil 4.11. *Helicobacter pylori* grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranil asetat-Kurşun sitrat X30 000

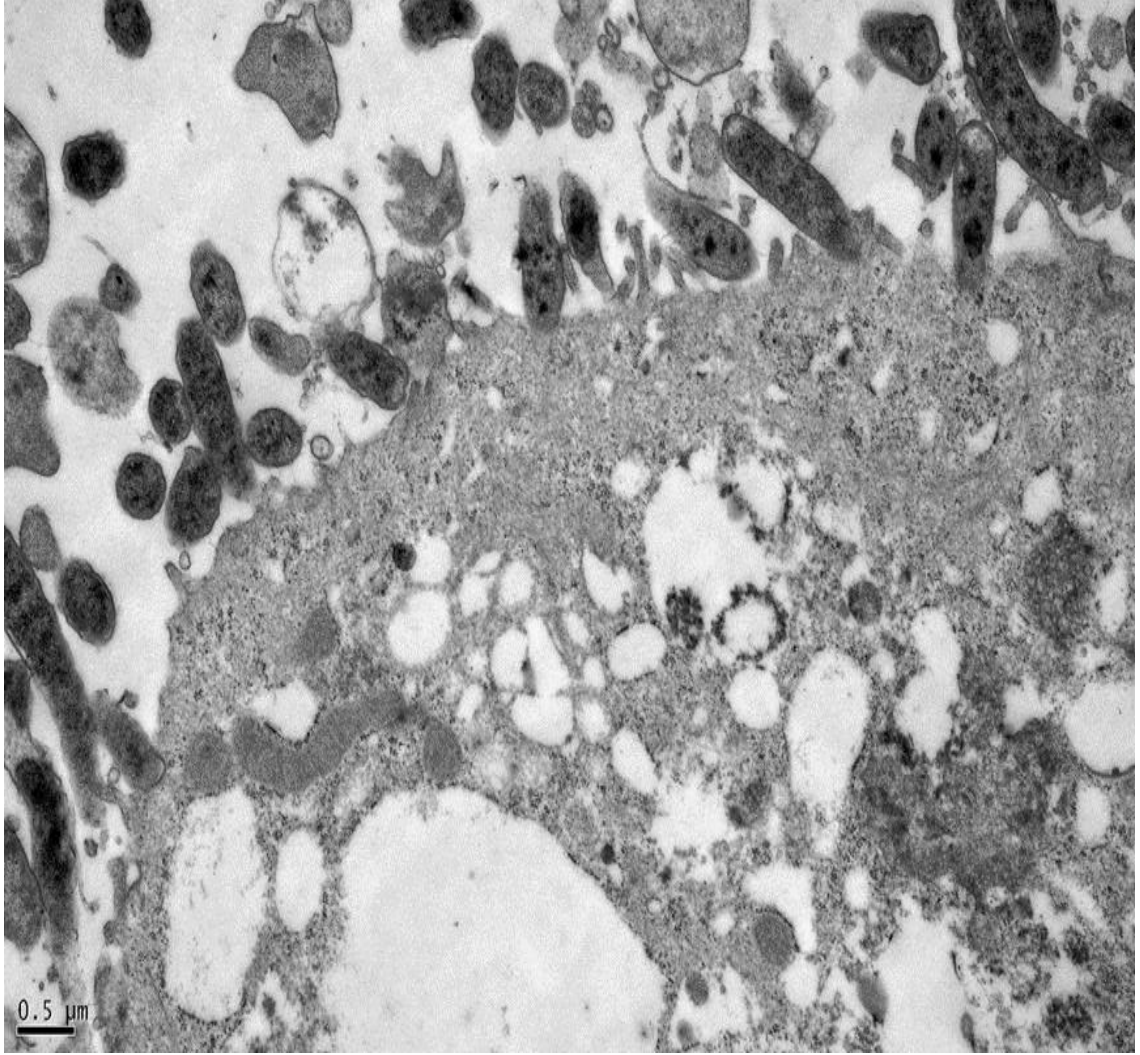
Daha büyük büyütmede *Helicobacter pylori* ile inkübe edilen grupta AGS hücrelerinin çevresinde hücre membranına tutunmuş *Helicobacter pylori* kesitleri, AGS hücre sitoplazmasında vakuoller ve membran ile çevrili heterojen içeriğe sahip yapılar gözlenmektedir.



**Şekil 4.12.** *Helicobacter pylori* grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranyl asetat-Kurşun sitrat X8 000

*Helicobacter pylori* ile inkübe edilen grupta çok sayıda *Helicobacter pylori* ile çevrili olan AGS hücrelerinde çok sayıda vakuol ve karyolizis gözlenmektedir.



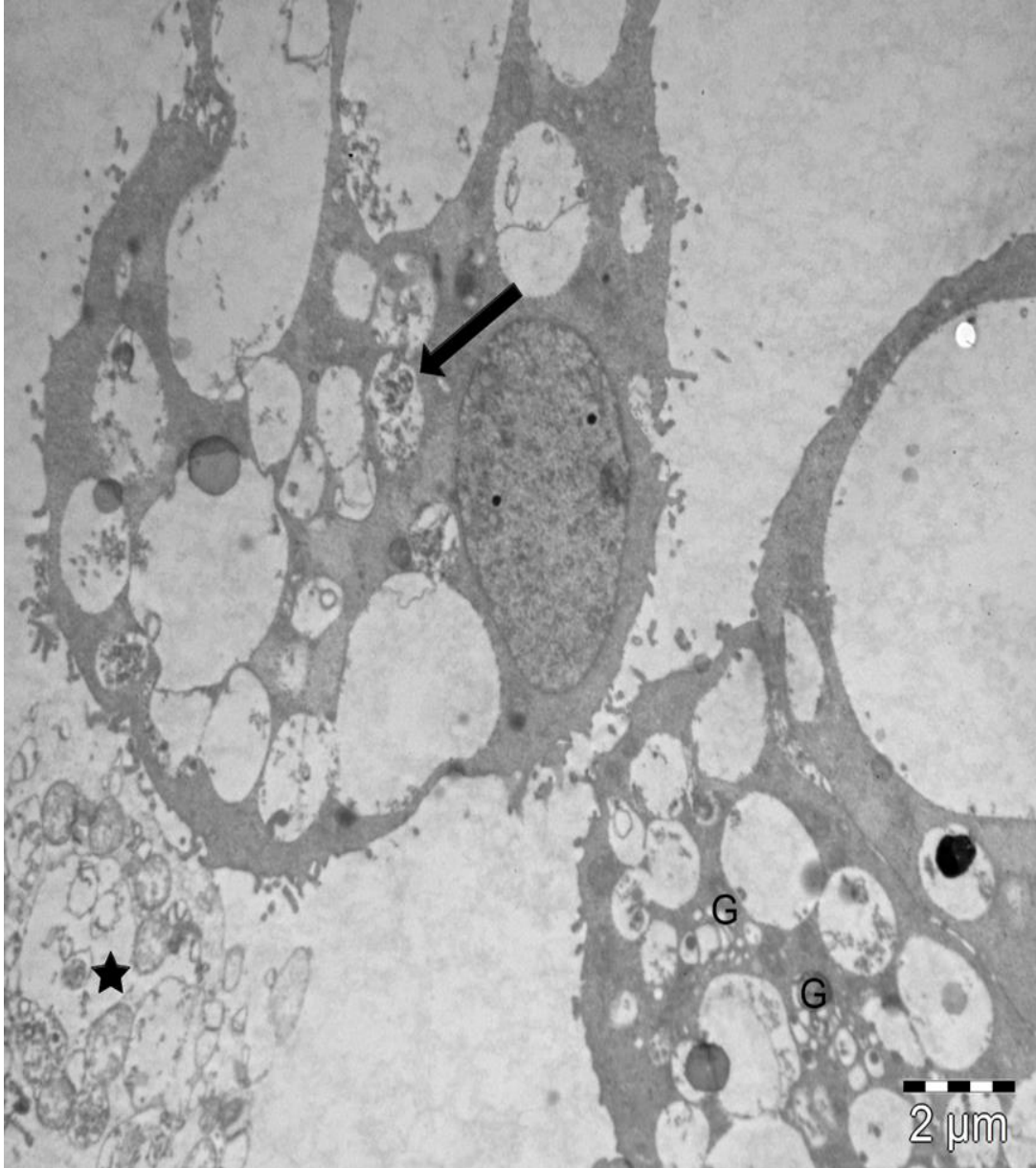
**Şekil 4.13.** *Helicobacter pylori* grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranyl asetat-Kurşun sitrat X20 000

Daha büyük büyütmede AGS hücre sitoplazmasında çok sayıda vakuol ve karyolizis gözlenmektedir.

### **Nu7441 Grubu**

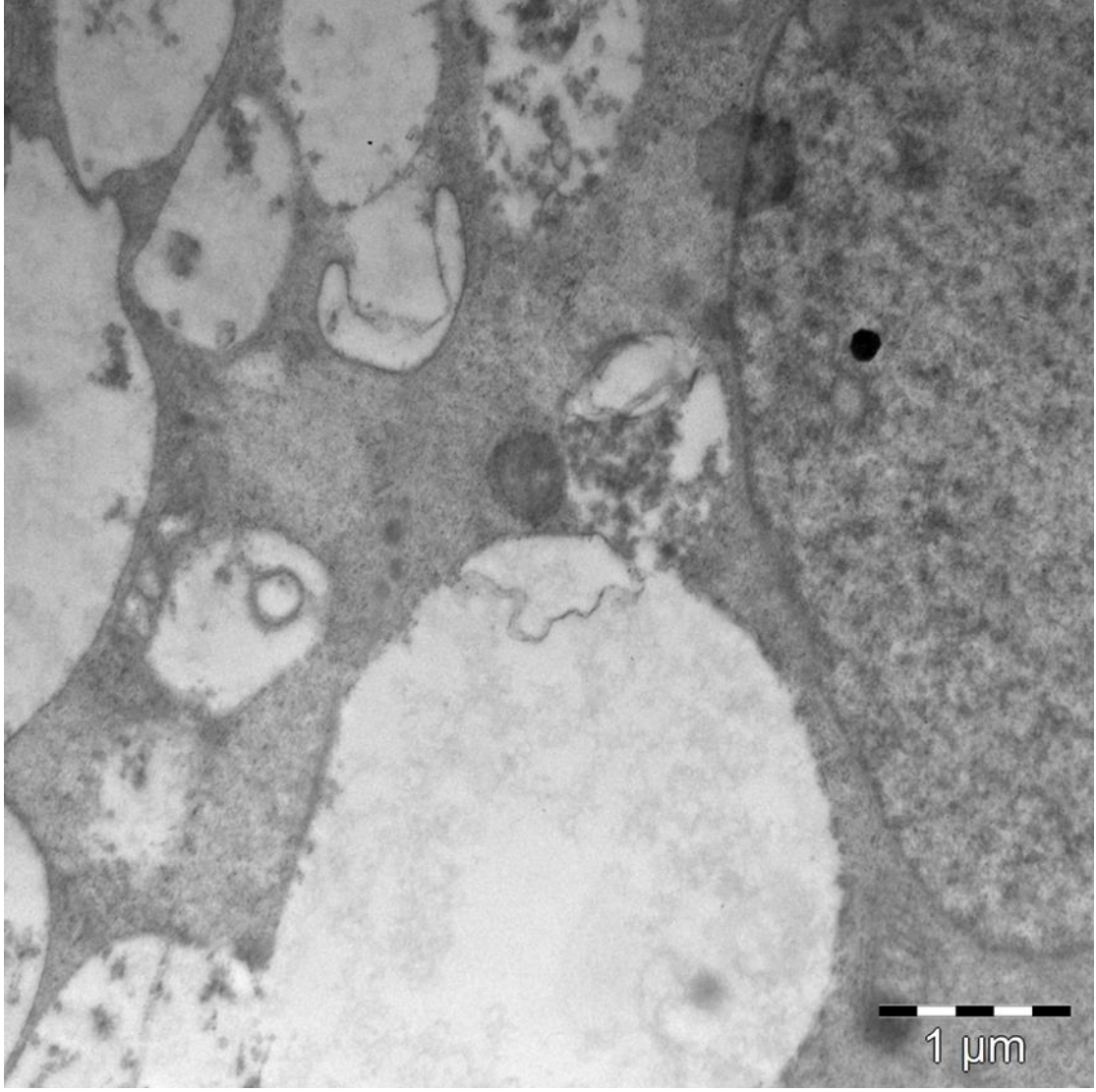
Nu7441 uygulanan grupta, çekirdeği intakt, sitoplazmasında büyük vakuoller yanı sıra otofajik vakuller ile dolu çekirdeği kenara itilmiş AGS hücrelerinin yanısıra tamamen dejenere olmuş hücreler de izlenmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). AGS hücrelerinde yer yer genişlemiş golgi organeli gözlenmiştir.



**Şekil 4.14.** Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranil asetat-Kurşun sitrat X7500.

Nu7441 uygulanan grupta çekirdeği sağlam ancak vakuoller ile kenara itilmiş AGS hücresi yanısıra tamamen dejenere olmuş (yıldız) hücre izlenmektedir. Hücrelerin sitoplazmasında otofajik vakuoller (ok) yer yer genişlemiş golgi organeli (G) gözlenmektedir.



**Şekil 4.15.** Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

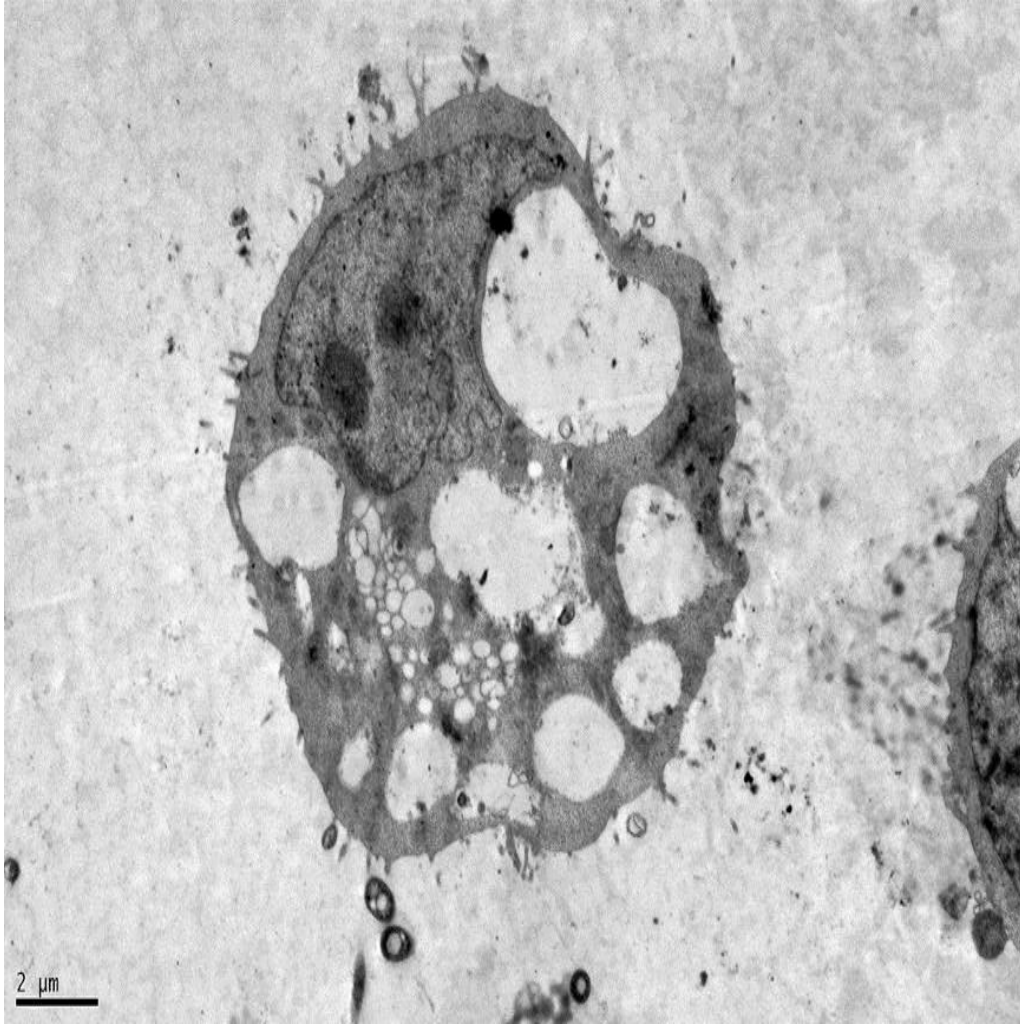
Uranyl asetat-Kurşun sitrat x25 000.

Daha büyük büyütmede, çekirdek membranı ve altında heterokromatin dağılımı ile sağlam çekirdek, sitoplazmada otofajik vakuoller izlenmektedir.

### **HP+ Nu7441 Grubu**

*Helicobacter pylori* ve Nu7441 ile inkube edilen AGS hücrelerinin çevresinde *Helicobacter pylori* kesitleri gözlenmiştir. AGS hücrelerinin sitoplazmasındaki çok sayıda vakuol ile çekirdeğin kenara itildiği izlenmiştir. Sitoplazmanın merkezinde daha ufak vakuoller gözlenirken hücre membranına yakın vakuollerin oldukça

irileştiği belirlenmiştir. Sitoplazmada içi boş vakuoller yanırıra otofajik vakuollerde gözlenmiştir (şekil 4.16., şekil 4.17., şekil 4.18., şekil 4.19.).



**şekil 4.16.** HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranil asetat-Kurşun sitrat X8000

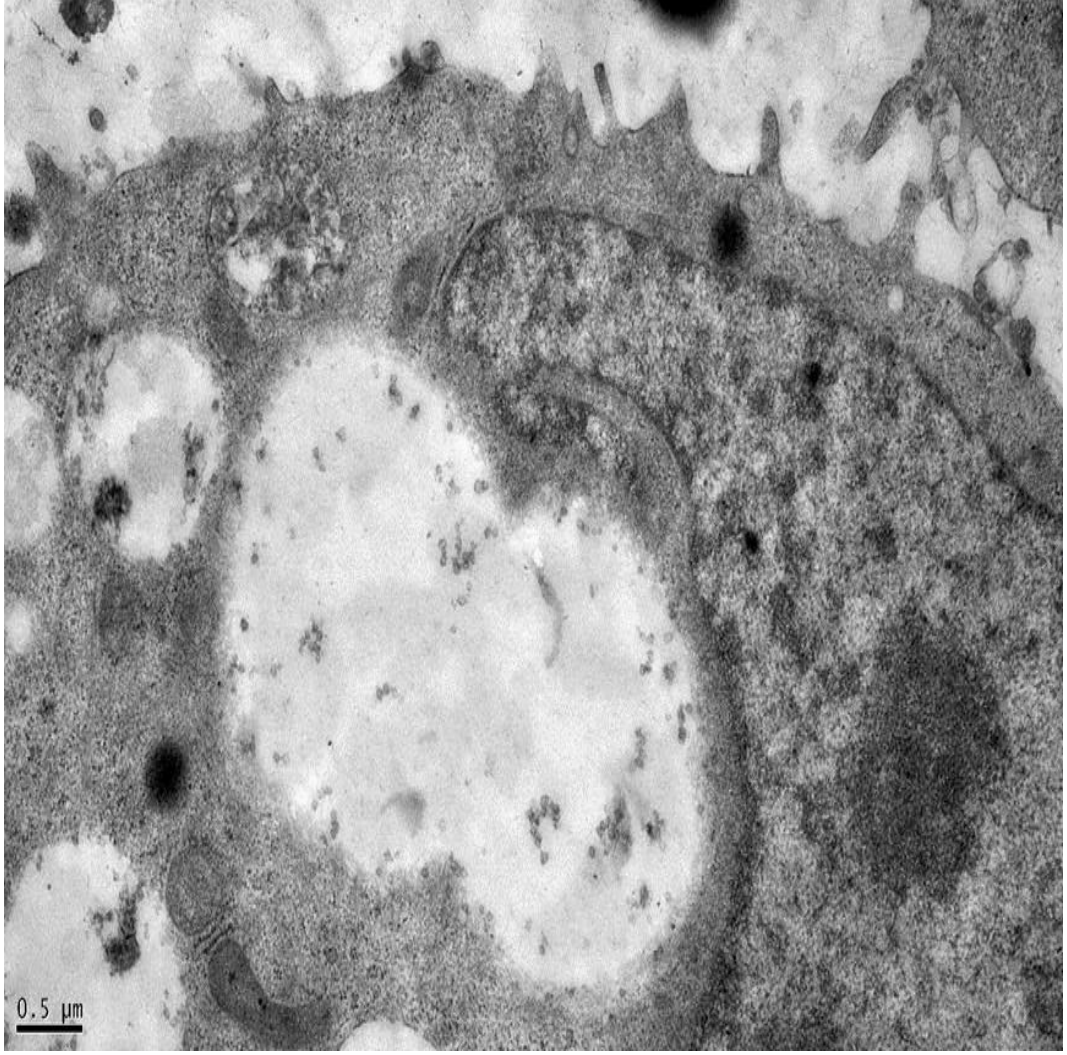
*Helicobacter pylori* ve Nu7441 ile inkube edilen grupta AGS hücrelerinin çevresinde *Helicobacter pylori* kesitleri, AGS hücrelerinin sitoplazmasındaki çok sayıda irili ufaklı vakuol ile çekirdeğin kenara itildiği izlenmektedir.



**Şekil 4.17.** HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranyl asetat-Kurşun sitrat X15 000

Sitoplazmanın merkezinde daha ufak vakuoller gözlenirken hücre membranına yakın vakuollerin oldukça irileştiği, içi boş vakuoller yanısıra otofajik vakuollerde gözlenmektedir.

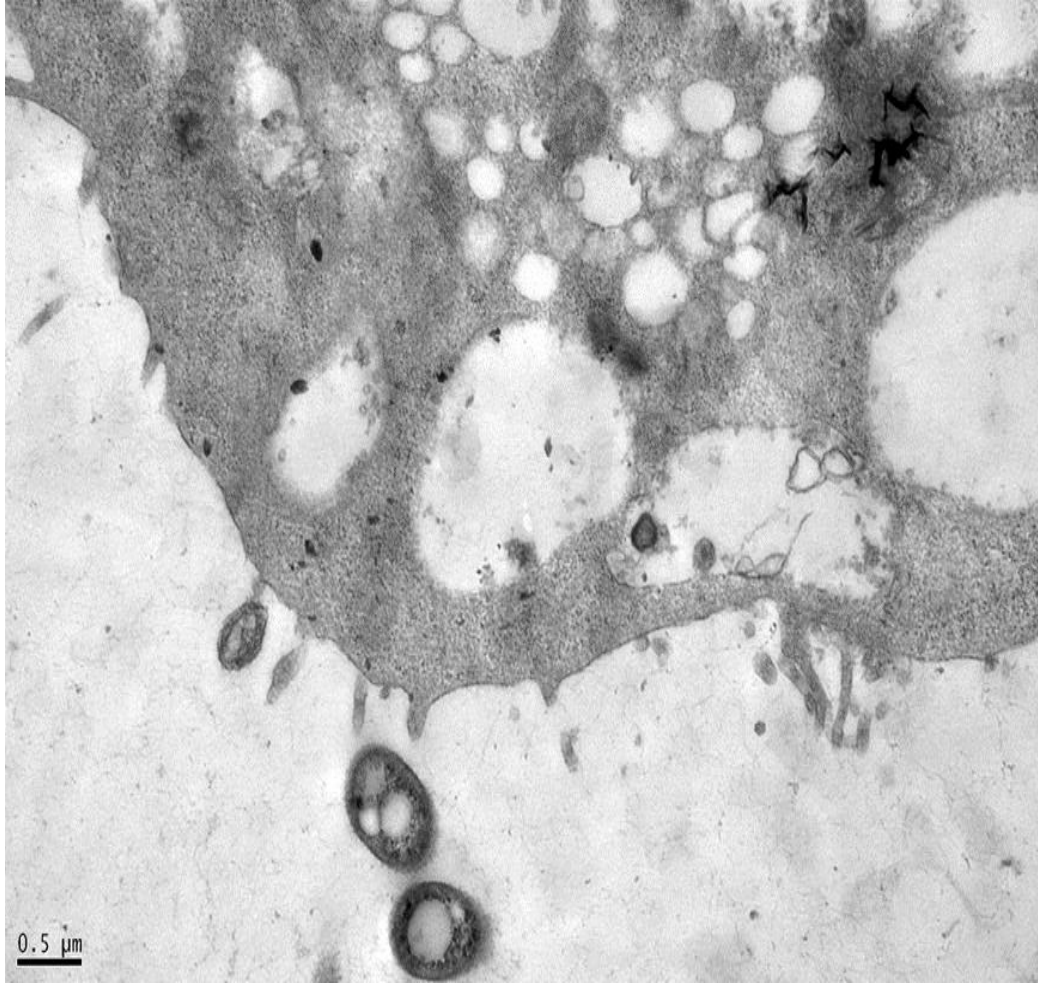


**Şekil 4.18.** HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranil asetat-Kurşun sitrat X25 000

Daha büyük büyütmede memebranın hemen altında yerleşmiş çekirdek, granüllü endoplazma retikulumu, mitokondriyon, içi boş iri vakuoller ve otofajik vakuol gözlenmektedir.





**Şekil 4.19.** HP+ Nu7441 grubuna ait elektron mikroskopisi görüntüleri

Uranyl asetat-Kurşun sitrat X25 000

Büyük büyütmede hücre komşuluğunda *Helicobacter pylori* kesitleri, hücre içinde merkezde daha küçük periferde daha büyük vakuoller izlenmektedir.

### **4.3. Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Üretiminin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar**

Çalışma gruplarında hücre içi ROS değerleri kontrol grubuna göre % olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre hücre içi ROS düzeyleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.20' de verilmiştir. ROS düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Kontrol+Nu7441 grubunda %20,37, HP grubunda % 20,83 ve Nu7441+HP grubunda %20,44

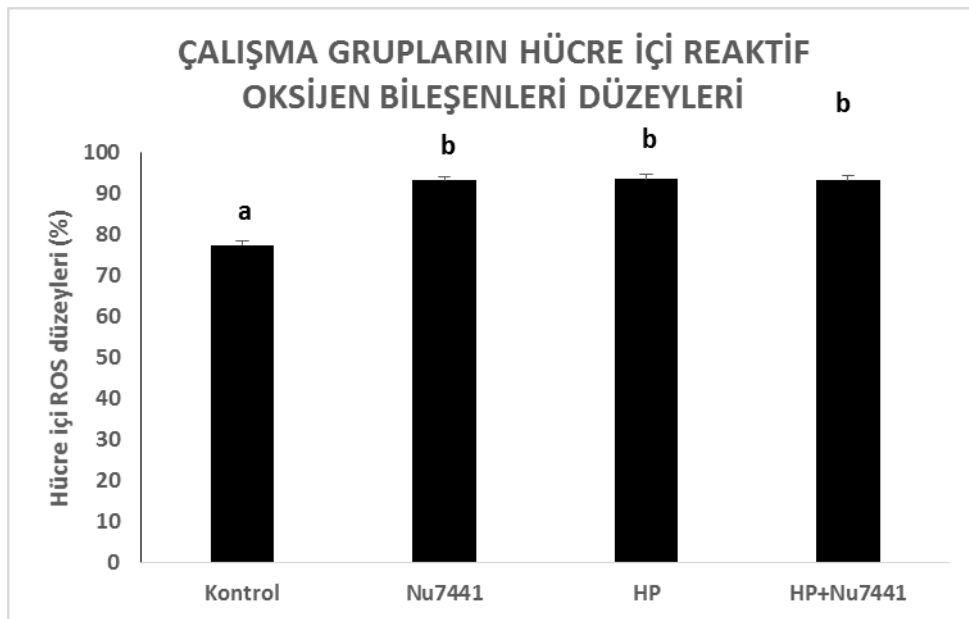
oranlarında artış tespit edilmiş olup, tüm bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.2.** Hücre içi Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Kontrole göre (%) Artış Oranları

Çalışma Grupları	ROS Düzeyleri ( Kontrole Göre %)
<b>Kontrol</b>	%100 <sup>a</sup>
<b>Nu7441</b>	%20,37 <sup>b</sup>
<b>HP</b>	%20,83 <sup>b</sup>
<b>HP+Nu7441</b>	%20,44 <sup>b</sup>

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.20.** Hücre içi ROS Düzeyleri (Kontrole göre % olarak verilmiştir)

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.<sup>a,b</sup>

Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).

#### 4.4. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.

##### 4.4.1. Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi

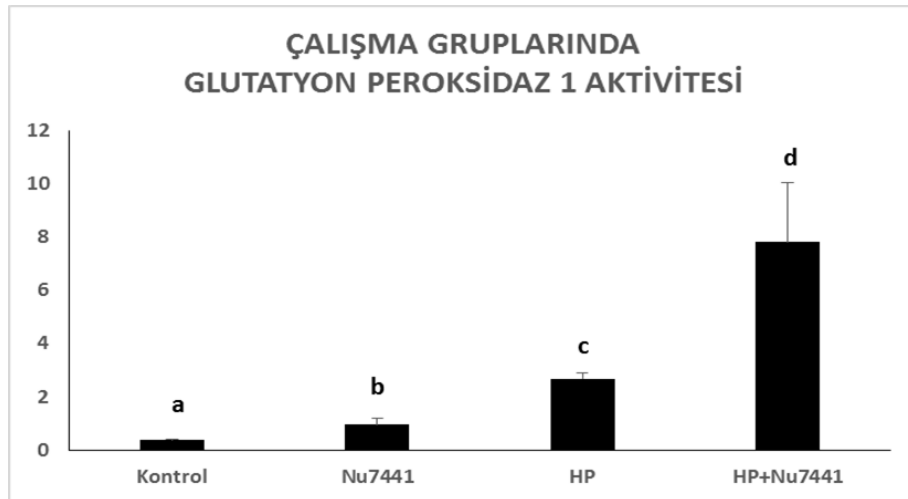
Çalışma gruplarına ait GPx aktivitesi Tablo 4.3 ve Şekil 4.21’de verilmiştir. Tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre GPx aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). Bu artış kontrole göre Nu7441 grubunda %160, HP grubunda %179, HP+Nu7441 grubunda ise %190 olarak belirlenmiştir. HP+Nu7441 grubu ile HP grubu karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubunda HP grubuna göre 2,90 kat daha yüksek GPx aktivitesi belirlenmiştir.

**Tablo 4.3.** Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi

Çalışma Grupları	GPx Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)
Kontrol	0,37±0,01 <sup>a</sup>
Nu7441	0,96±0,22 <sup>b</sup>
HP	2,69±0,22 <sup>c</sup>
HP+Nu7441	7,81±2,22 <sup>d</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.21.** Glutasyon Peroksidaz 1 Aktivitesi (nmol/dak/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).

#### 4.4.2. Katalaz Aktivitesi

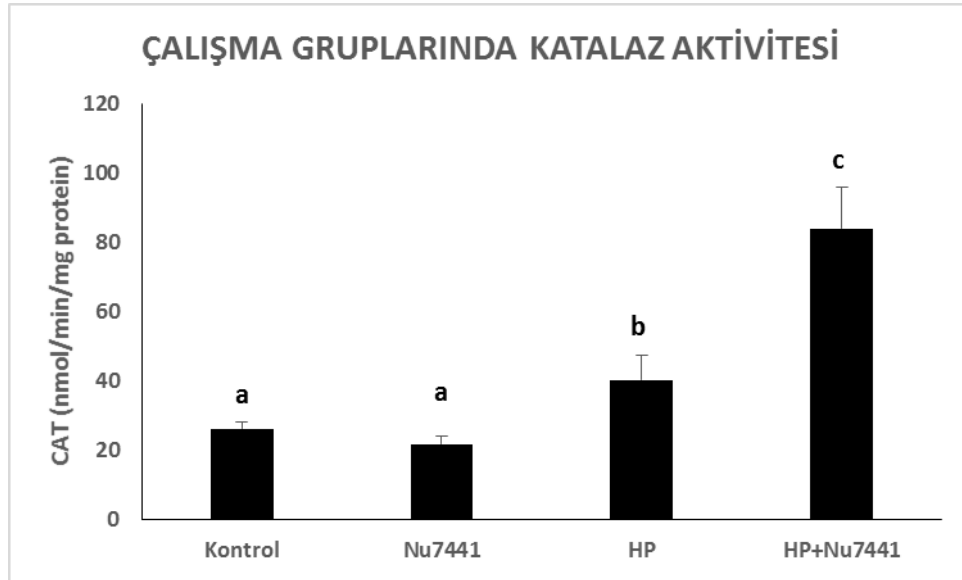
Çalışma gruplarına ait katalaz aktivitesi Tablo 4.4 ve Şekil 4.22’de verilmiştir. Kontrol grubunda bulunan örneklerde CAT aktivitesi  $26,10 \pm 2,00$  nmol/min/protein, Nu7441 grubunda  $21,74 \pm 2,20$  nmol/min/protein, HP grubunda  $40,27 \pm 7,06$  nmol/min/protein ve Nu744+HP grubunda  $83,79 \pm 12,12$  nmol/min/protein olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla HP (%85) ve HP+Nu7441 (%108) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). HP grubu ile HP+Nu7441 grubu karşılaştırıldığında ise, HP+Nu7441 grubunda CAT aktivitesinin yaklaşık 2,1 kat oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir.

**Tablo 4.4.** Katalaz Aktivitesi

Çalışma Grupları	Katalaz Aktivitesi ( nmol/dak/mg protein)
Kontrol	$26,10 \pm 2,00^a$
Nu7441	$21,74 \pm 2,40^a$
HP	$40,27 \pm 7,06^b$
HP+Nu7441	$83,79 \pm 12,12^c$

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.22.** Katalaz Aktivitesi ( nmol/dak/mg protein)

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi

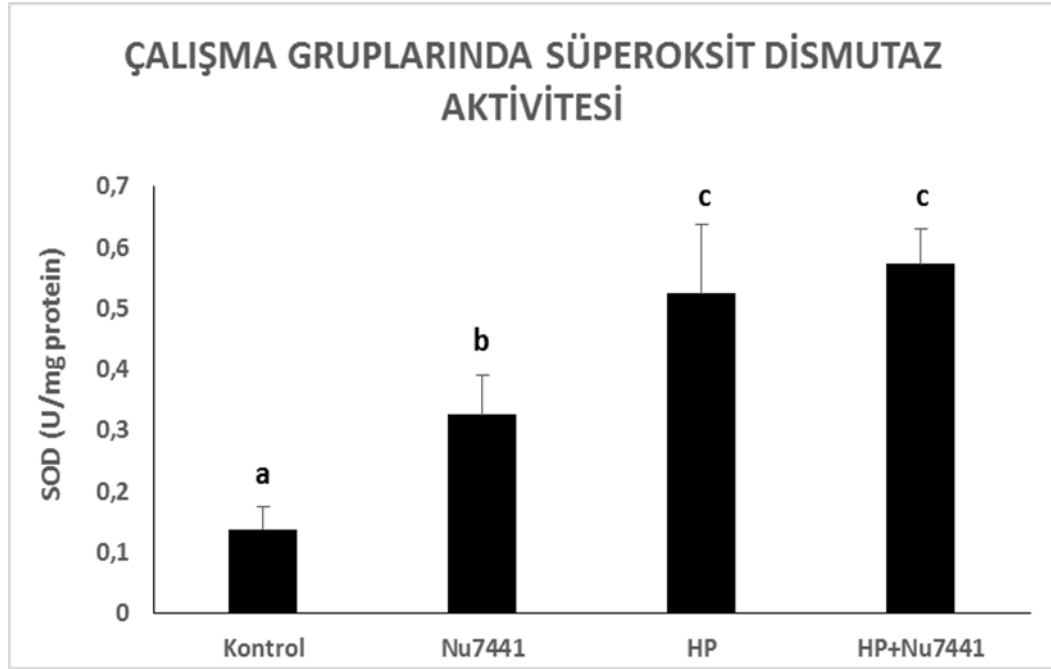
Çalışma gruplarına ait SOD aktivitesi Tablo 4.5 ve Şekil 23'de verilmiştir. SOD aktivitesinde kontrol grubuna oranla Nu7441 grubunda %136,31 (2,36 kat), HP grubunda %279,95 (3,8 kat) ve HP+Nu7441 grubunda %315,48'lik (4,15 kat) bir artış meydana gelmiş olup tüm çalışma gruplarındaki artış istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.5.** Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Çalışma Grupları	SOD Aktivitesi ( U/mg protein)
Kontrol	0,138±0,0379 <sup>a</sup>
Nu7441	0,326±0,065 <sup>b</sup>
HP	0,524±0,113 <sup>c</sup>
HP+Nu7441	0,573±0,059 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.23.** Süperoksit Dismutaz Aktivitesi ( U/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).

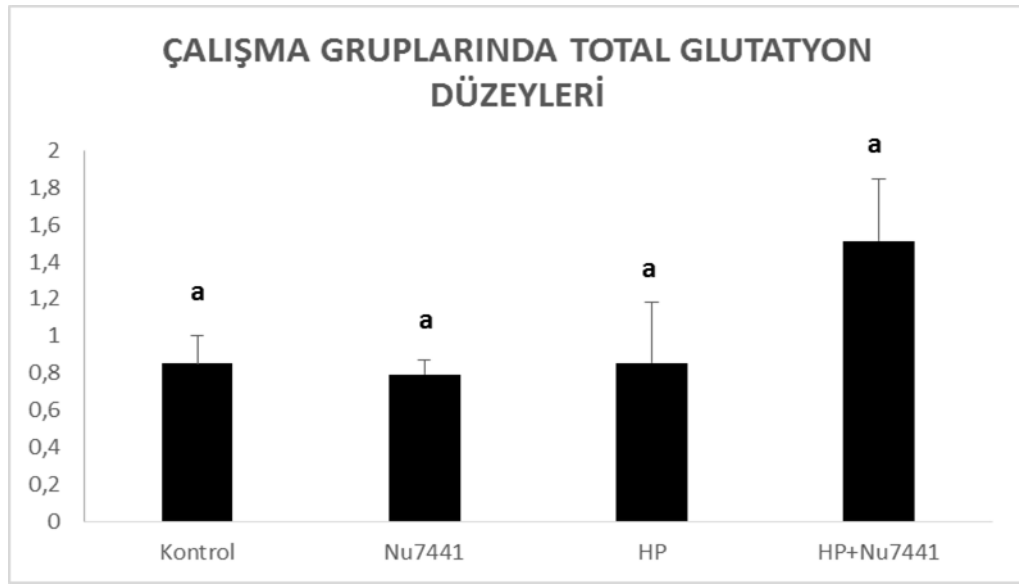
#### 4.6. Total Glutasyon Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait total GSH düzeyleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.24'da verilmiştir. Total GSH düzeylerinde kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda anlamlı olmaya bir artış (%77,54) tespit edilirken, diğer çalışma gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

**Tablo 4.6.** Total GSH Düzeyleri

Çalışma Grupları	Total Glutasyon Düzeyleri(nmol/mgprotein)
Kontrol	0,85±0,015 <sup>a</sup>
Nu7441	0,79±0,08 <sup>a</sup>
HP	0,86±0,32 <sup>a</sup>
HP+Nu7441	1,51±0,33 <sup>a</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.



**Şekil 4.24.** Total GSH Düzeyleri ( nmol/mgprotein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

#### 4.7. Total Antioksidan Kapasite (TAOC) Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait total antioksidan kapasite düzeyleri Tablo 4.7 ve Şekil 25'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla HP (%70,34) ve HP+Nu7441 (%40,31)

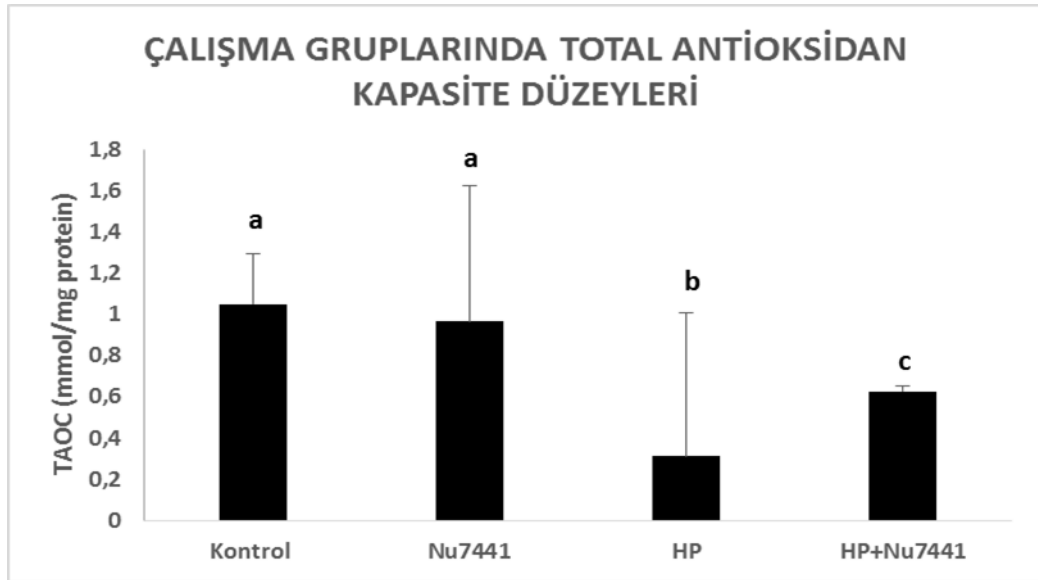
gruplarında TAOC düzeylerinin azaldığı görülmüş ve bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.7.** TAOC Düzeyleri

Çalışma Grupları	TAOC Düzeyleri (nmol/mgprotein)
Kontrol	1,05±0,25 <sup>a</sup>
Nu7441	0,96±0,66 <sup>a</sup>
HP	0,31±0,70 <sup>b</sup>
HP+Nu7441	0,63±0,02 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.25.** TAOC Düzeyleri (nmol/mgprotein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p<0,05$ ).

#### 4.8. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri (TBARS) Düzeyleri

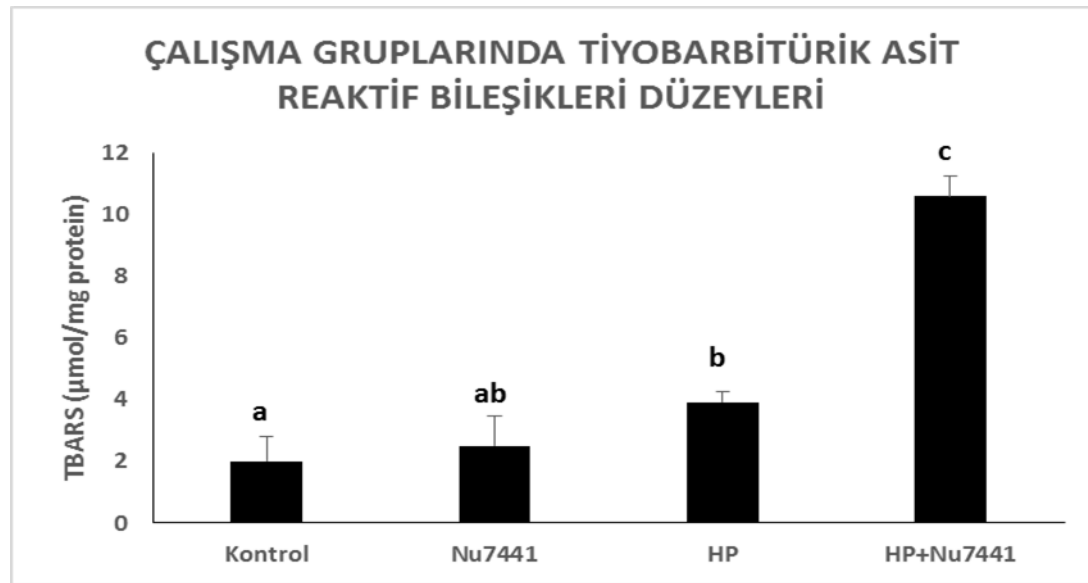
Çalışma gruplarına ait TBARS düzeyleri Tablo 4.8 ve Şekil 26'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla HP (%95) ve HP+ Nu7441 (%428, yaklaşık 5,28 kat) gruplarında TBARS düzeylerinin anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.8.** TBARS Düzeyleri

Çalışma Grupları	TBARS Düzeyleri (nmol/mg protein)
Kontrol	2,00±0,037 <sup>a</sup>
Nu7441	0,326±0,065 <sup>a,b</sup>
HP	0,524±0,113 <sup>b</sup>
HP+Nu7441	0,573±0,0059 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.26.** TBARS Düzeyleri (nmol/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden ölçüde farklıdır (p<0,05).

#### 4.9. Protein Karbonil Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait protein karbonil düzeyleri Tablo 4.9 ve Şekil 27'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla tüm çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Bu artışlar Nu7441 grubunda %46,74, HP grubunda %194,88 (2,95 kat) ve HP+Nu7441 grubunda ise %362 (4,62 kat) olarak belirlenmiştir. HP ve HP+Nu7441 grubu karşılaştırıldığında HP+Nu7441 grubunda, HP grubuna göre protein karbonil düzeylerinde %56,70 oranında daha fazla artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

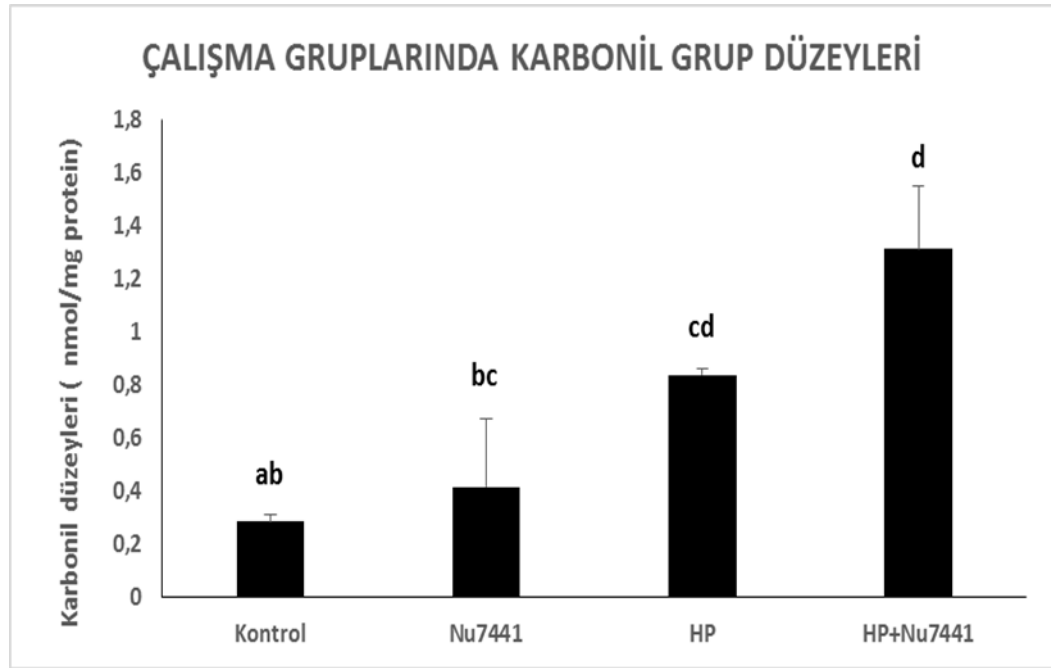


**Tablo 4.9.** Protein Karbonil Düzeyleri

Çalışma Grupları	Protein Karbonil Düzeyleri (nmol/mgprotein)
Kontrol	0,28±0,02 <sup>a,b</sup>
Nu7441	0,42±0,26 <sup>b,c</sup>
HP	0,84±0,02 <sup>c,d</sup>
HP+Nu7441	1,31±0,24 <sup>d</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.27.** Protein Karbonil Düzeyleri (nmol/mgprotein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

#### 4.10. DNA Baz Hasarı Analizleri

##### 8-Hidroksideoksiganozin (8-OHdG) Düzeyleri

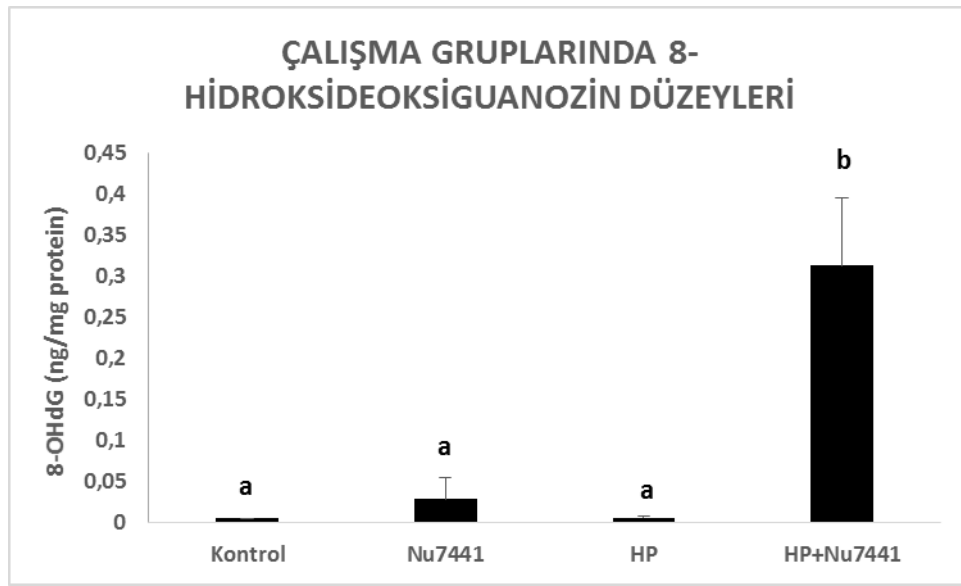
8-OHdG düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.10 ve Şekil 4.28'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda 8-OHdG düzeylerinde artış bulunmuştur (56 kat, p<0,05). Diğer çalışma gruplarında önemli bir değişiklik görülmemiştir.

**Tablo 4.10.** 8-OHdG Düzeyleri

Çalışma Grupları	8-OHdG Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	0,01±0,00 <sup>a</sup>
Nu7441	0,03±0,03 <sup>a</sup>
HP	0,01±0,00 <sup>a</sup>
HP+Nu7441	0,31±0,08 <sup>b</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.28.** 8-OHdG Düzeyleri (ng/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

#### 4.11. DNA Onarım Proteini ( OGG1) Düzeyleri

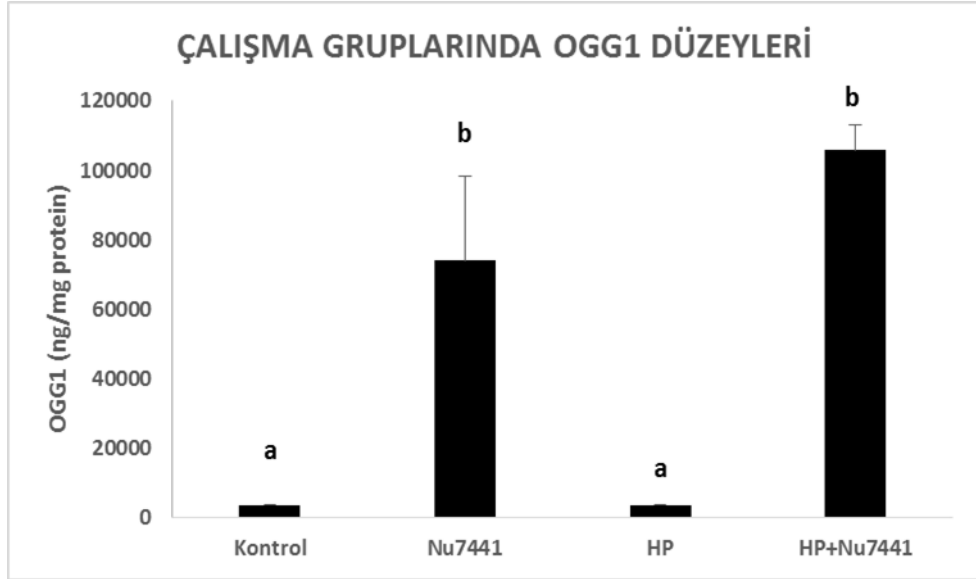
OGG1 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.11 ve Şekil 4.29'da verilmiştir. OGG1 düzeylerinde kontrol grubuna göre Nu7441 grubunda 20,62 kat ve HP+Nu7441 grubunda ise 29,53 kat artış görülmüştür ve her iki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

**Tablo 4.11.** OGG1 Düzeyleri

Çalışma Grupları	OGG1 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	3584,21±0,00 <sup>a</sup>
Nu7441	73934±24568 <sup>b</sup>
HP	3584,21±0,00 <sup>a</sup>
HP+Nu7441	105860,28±781,66 <sup>b</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.29.** OGG1 Düzeyleri (ng/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

## 4.12. DNA Çift Kırıkları Düzeyleri

### 4.12.1. H2AX Düzeyleri

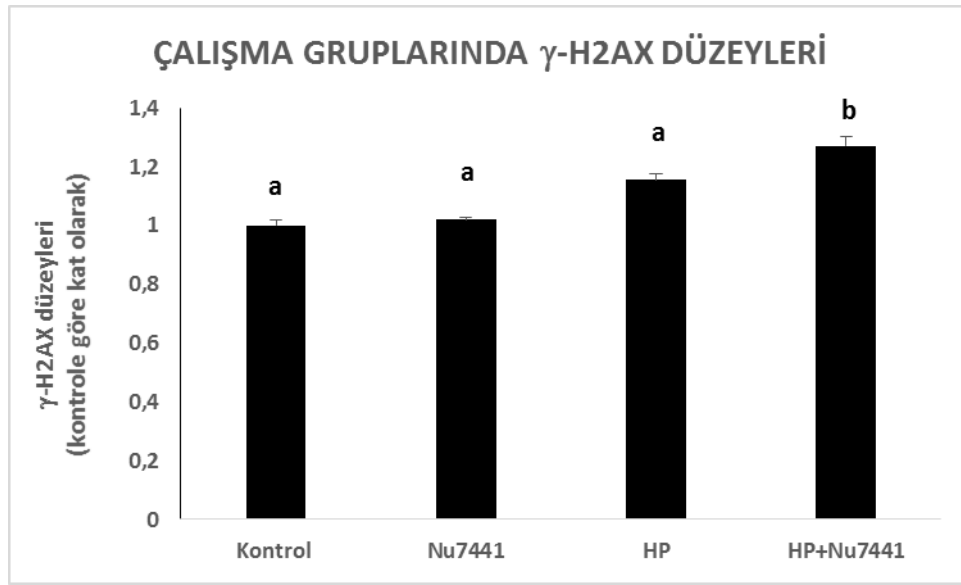
$\gamma$ - H2AX düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.12 ve Şekil 4.30'da verilmiştir. Kontrol grubuna göre HP +Nu7441 grubunda %27'lik anlamlı bir artış tespit edilmiştir. HP grubunda ise %15,4'lük bir artış gözlenmiştir; ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır.

**Tablo 4.12.**  $\gamma$ -H2AX Düzeyleri

Çalışma Grupları	$\gamma$ - H2AX Düzeyleri (Kontrole göre kat olarak)
Kontrol	1 <sup>a</sup>
Nu7441	1,02 <sup>a</sup>
HP	1,15 <sup>a</sup>
HP +Nu7441	1,27 <sup>b</sup>

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p < 0,05$ ).

**Şekil 4.30.**  $\gamma$ -H2AX Düzeyleri (Kontrole göre kat olarak)

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ( $p < 0,05$ ).

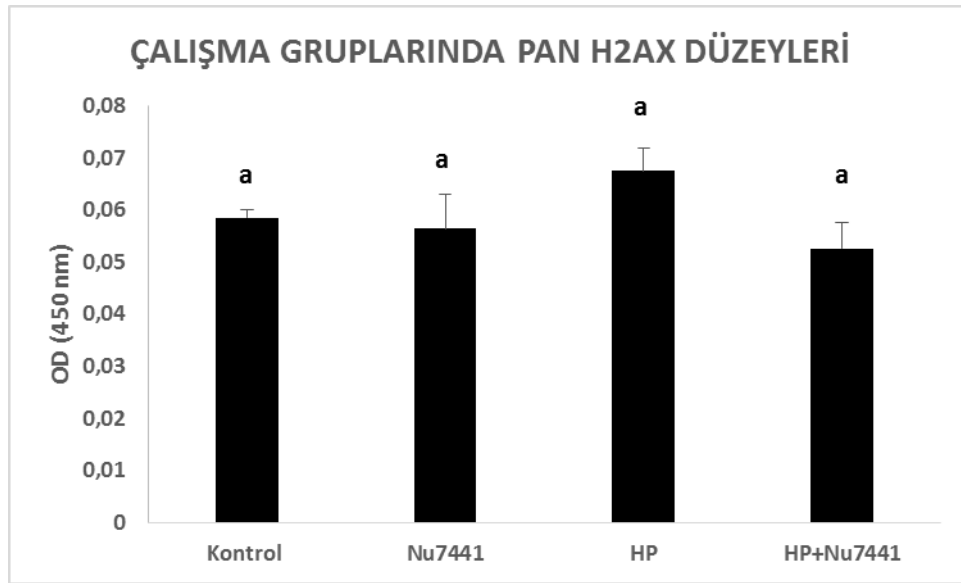
#### 4.12.2. Pan $\gamma$ - H2AX Düzeyleri

Pan  $\gamma$ - H2AX düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.13 ve Şekil 4.31'de verilmiştir. Pan  $\gamma$ - H2AX düzeylerinde kontrol grubu ile Nu7441 ve HP+Nu7441 grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). HP grubunda görülen %15'lik artış da istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4.13.** Pan  $\gamma$ -H2AX Düzeyleri

<b>Çalışma Grupları</b>	<b>Pan <math>\gamma</math>- H2AX Düzeyleri (Kontrole göre kat olarak)</b>
Kontrol	1 <sup>a</sup>
Nu7441	0,97 <sup>a</sup>
HP	1,15 <sup>a</sup>
HP+Nu7441	0,90 <sup>a</sup>

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

**Şekil 4.31.** Pan  $\gamma$ - H2AX Düzeyleri (Kontrole göre kat olarak)

Tüm değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir

### 4.13. Apoptotik Analizler

#### 4.13.1. Kaspaz 3 Düzeyleri

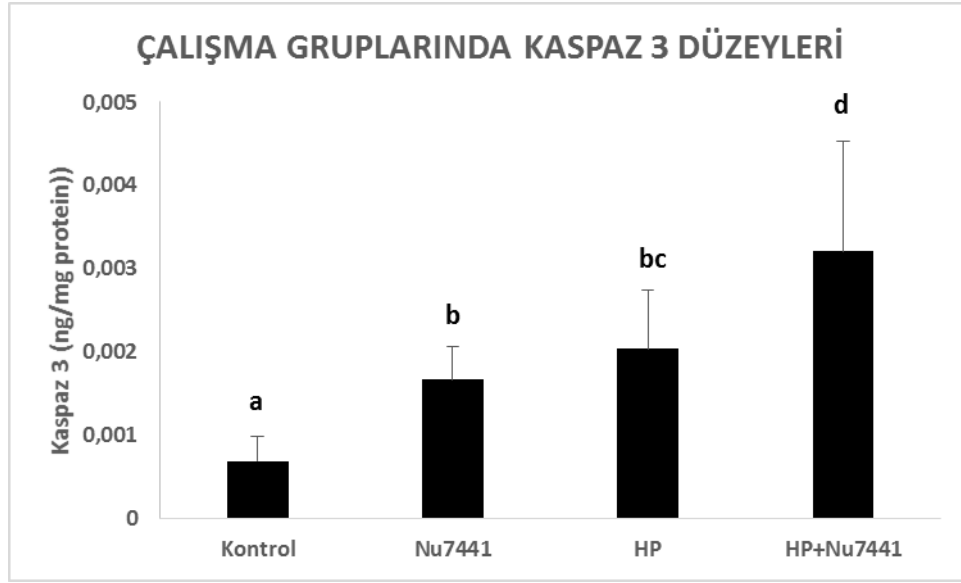
Kaspaz 3 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.14 ve Şekil 4.32’de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla tüm çalışma gruplarında kaspaz 3 düzeyleri istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu artış Nu7441 grubunda %142 (2,42 kat), HP grubunda %196 (2,96 kat) ve HP+Nu7441 grubunda %366 (4,66 kat) olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.14.** Kaspaz 3 Düzeyleri

Çalışma Grupları	Kaspaz 3 Düzeyleri (ng/mg protein) (Kontrole göre % olarak)
Kontrol	0,00689±0,0003 <sup>a</sup>
Nu7441	0,00167±0,0003 <sup>b</sup>
HP	0,0020±0,0007 <sup>b,c</sup>
HP+Nu7441	0,0032±0,0013 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.32.** Kaspaz 3 Düzeyleri (ng/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

#### 4.13.2. Kaspaz 8 Düzeyleri

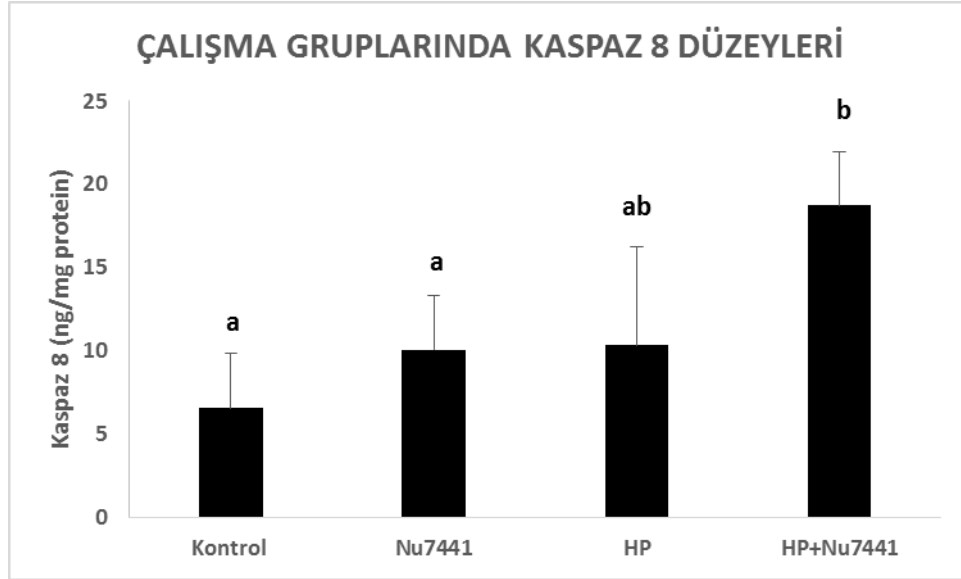
Kaspaz 8 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.13 ve Şekil 4.33'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda kaspaz 8 düzeyleri istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur (%186,68, 2,86 kat, p<0,05). Nu7441 (%53,54) ve HP (%57,74) gruplarında isese anlamlı bulunmayan artışlar belirlenmiştir.

**Tablo 4.15.** Kaspaz 8 Düzeyleri

Çalışma Grupları	Kaspaz 8 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	6,56±3,30
Nu7441	10,07±3,22 <sup>a</sup>
HP	10,34±5,89 <sup>ab</sup>
HP+Nu7441	18,73±3,21 <sup>b</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.33.** Kaspaz 8 Düzeyleri (ng/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

a ± SD olarak verilmiştir.

#### 4.14. Otofaji Analizleri

##### 4.14.1. Beclin-1 Düzeyleri Analizleri

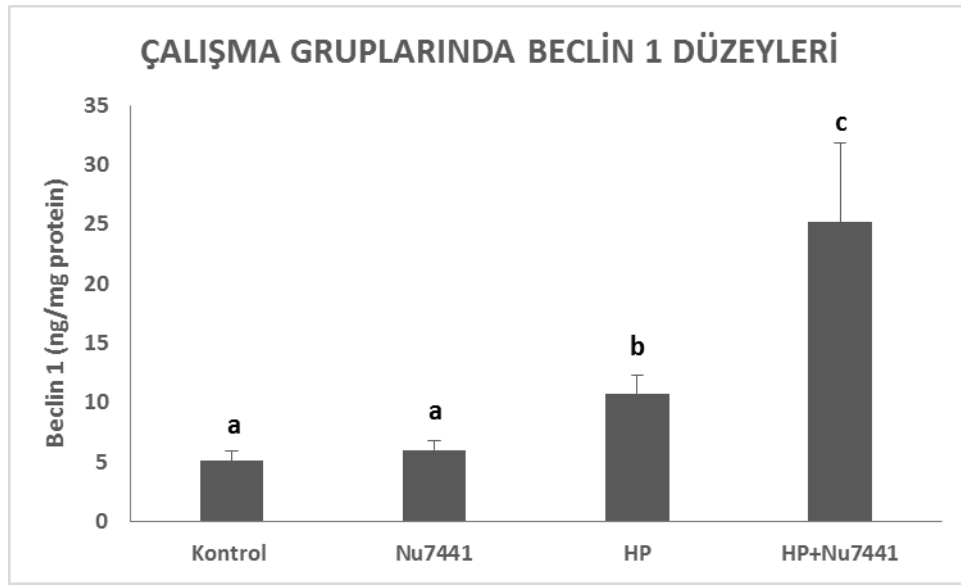
Beclin-1 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.16 ve Şekil 4.34'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla HP (% 110, 2,1 kat) ve HP+Nu7441 (%392, 4,93 kat) gruplarında Beclin-1 düzeylerinde artış tespit edilmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubundaki Beclin-1 düzeylerindeki artışın HP grubuna göre 2,34 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.16.** Beclin-1 Düzeyleri

Çalışma Grupları	Beclin-1 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	5,12±0,29 <sup>a</sup>
Nu7441	6,01±0,75 <sup>a</sup>
HP	10,75±1,53 <sup>b</sup>
HP+Nu7441	25,20±6,62 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup>Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.34.** Beclin-1 Düzeyleri (ng/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup>Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

#### 4.14.2. LC3 Düzeyleri Analizleri

LC3 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.17 ve Şekil 4.35'de verilmiştir. Kontrol grubuna oranla HP (3,35 kat) ve HP+Nu7441 (11,68 kat) gruplarında artış tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubundaki LC3 düzeylerindeki artışın HP grubuna göre 3,49 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

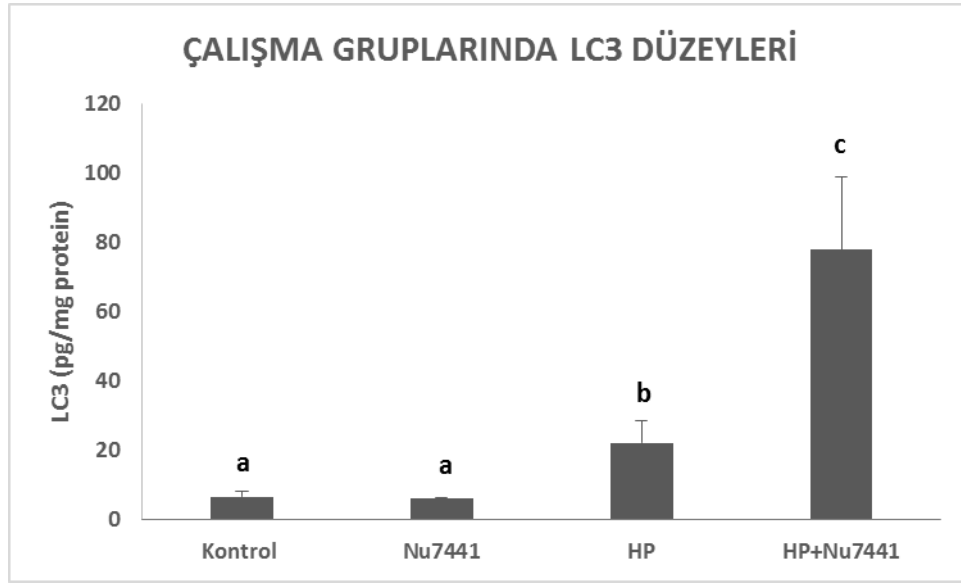


**Tablo 4.17. LC3 Düzeyleri**

Çalışma Grupları	LC3 Düzeyleri(ng/mg protein)
Kontrol	6,66±1,73 <sup>a</sup>
Nu7441	6,11±0,20 <sup>a</sup>
HP	22,29±6,23 <sup>b</sup>
HP+Nu7441	77,82±21,04 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.35. LC3Düzeyleri (ng/mg protein)**

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

#### 4.14.3. p62 Düzeyleri Analizleri

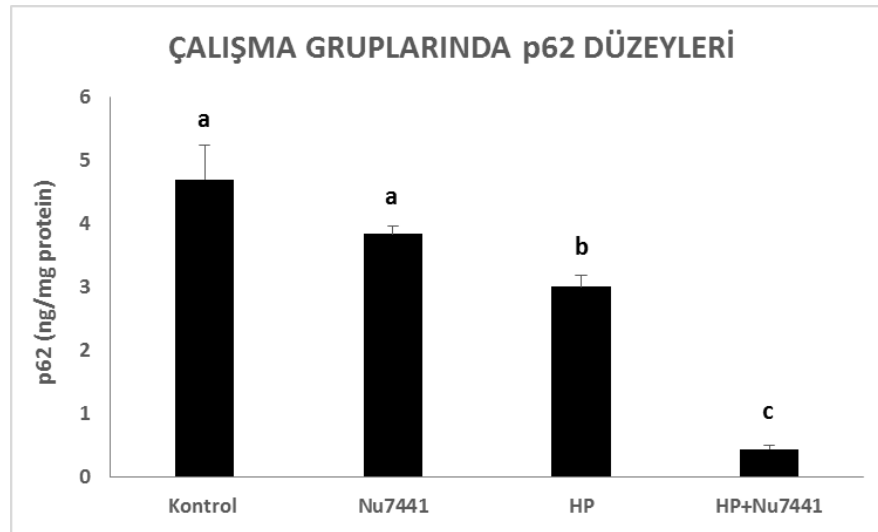
p62 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçları Tablo 4.18 ve Şekil 4.36'da verilmiştir. Kontrol grubuna oranla p62 düzeyleri HP (%35,92) ve HP+Nu7441 (%90,50) gruplarında anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05). HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubunda p62 düzeylerinin HP grubuna göre %85,17 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

**Tablo 4.18.** p62 Düzeyleri

Çalışma Grupları	P62 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	4,70±0,54 <sup>a</sup>
Nu7441	3,84±0,13 <sup>a</sup>
HP	3,01±0,17 <sup>b</sup>
HP+Nu7441	0,45±0,06 <sup>c</sup>

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup>Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

**Şekil 4.36.** p62 Düzeyleri (ng/mg protein)

Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup>Aynı harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır (p<0,05).

## 5. TARTIŞMA

Gastrik kanserler dünya genelinde kanser nedenli ölümlerinde ikinci sıradadır. Her yıl yaklaşık 1 milyon yeni tanı ve yılda yaklaşık 750.000 ölümlü vaka ile ünya genelinde görülen ölümlerde önemli bir yer tutmaktadır. Çok faktörlü bir hastalık olan gastrik kanserin risk faktörleri arasında çevresel faktörler, genetik faktörler, patojen (*Helicobacter pylori*)-konakçı ilişkisi rol oynar. Aynı zamanda tüm bu parametreler bir arada ve bir bütün olarak da etki edebilmektedir (9,215). Epidemiyolojik çalışmalar dünya çapındaki kanser vakalarının %16'sının infeksiyöz ajanlar yoluyla olduğunu göstermektedir. *Helicobacter pylori*'nin intestinal tip gastrik kanserlerin gelişiminde en önemli etken olduğu ve infeksiyon nedenli kanserlerin %5,5'ni oluşturduğu bilinmektedir (121,215). *Helicobacter pylori*'nin, insanda kronik gastrit, peptik ülser ve adenokarsinoma gibi çeşitli patolojilere yol açma mekanizmaları ilgili uzun yıllardır *in vivo* ve *in vitro* pekçok çalışma yapılmış ve pek çok bulgu elde edilmiştir (16).

*Helicobacter pylori*, gram negatif, mikroaerofilik, flagellalı ve heliks şeklinde bir bakteridir ve mide mukozasında kolonize olmaktadır (14). *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrik mukoza hasarında doğrudan ve dolaylı pek çok faktör rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, bakteriyel infeksiyonlar sırasında meydana gelen kronik inflamasyon gelişiminin, bakterilerce salınan genotoksinlerin ve bakteriyel ürünlerin konak genomunda mutasyona neden olarak hücre siklusunu etkileyebileceğini ve apoptoza yol açabileceğini göstermiştir (79) Konağın inflamatuvar cevabı, *Helicobacter pylori*'nin ürettiği üreaz, CagA, VacA ve BabA gibi spesifik virülans faktörleri ile gelişir. Bakterinin takiben gastrik epitelyal hücrelerde hasara ve gastrik mukosal bariyerin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (19).

*Helicobacter pylori*'nin hem doğrudan DNA hasarı yaparak, hem de epigenetik mekanizmalarla genetik instabiliteye neden olduğunu gösterilmiştir (174). Yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori* infeksiyonunun konakçının nükleer ve mitokondrial DNA'sında oksidatif hasara neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bakterinin DNA metilasyonunu etkileyerek de kromozomal instabilite, mikrostallit instabilite ve mutasyonlar gibi değişimlere neden olabildiği gösterilmiştir (14).

Çalışmalarda, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DSB'lere ve GSH tüketimine neden olduğu ve DSB onarım mekanizmalarına da etki ettiği gösterilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin en önemli virülans faktörlerinden biri olan VacA, epitel hücre yapısında birçok etkiye sahiptir (19,80-82);

- İnfeksiyonun başlatılması
- Membran permabilitesine etki ederek gastrik epitelyal bariyerin bozulması ve klorit iyonlarının sızması,
- İmmun cevabın modülasyonu (örneğin, T-hücre cevabının değişmesi)
- Endozomal kompartmanın tahribi ile antijen sunumunun bozulması
- Mitokondrial yapının bozulması ile transmembranal geçirgenlikte azalma; sitokrom c, kaspaz 8 ve kaspaz9 aktivasyonunda artış ve dolayısıyla apoptoz indüksiyonu
- ER stresi
- Bakterinin otofajiyal fonksiyonlarının değiştirilmesi
- Epitelyal hücrelerde oluşturduğu porlar aracılığıyla intraselüler geçirgenlikte artış; dolayısıyla besin maddeleri ve iyonlarının salınımında ve aynı zamanda üre ve anyon salınımında artış

Son yıllarda *Helicobacter pylori*'nin bir diğer önemli virülans faktörlerinden olan CagA ile de çok fazla sayıda çalışma yapılmaktadır. CagA pozitif suşlarla yapılan çalışmalarda, bu suşlarla infeksiyonun daha yüksek oranda nötrofilik ve mononükleer hücre infiltrasyonuna, çok daha ciddi atrofiye, intestinal metaplaziye, gastrik epitelyal hücre siklusunda değişimlere ve apoptoza neden olduğunu göstermiştir ((95).

*Helicobacter pylori* infeksiyonu sonucu gelişen karsinogenezde, ROS üretiminin neden olduğu başta DNA hasarı olmak üzere birçok makromoleküldeki hasarın da etkin rol oynadığı iddia edilmektedir (13). Yapılan *in vivo* çalışmalarda *Helicobacter pylori* ile infekte bireylerde ROS düzeylerinin yükseldiği ve oksidatif DNA hasarının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalarda da *Helicobacter pylori*'nin doğrudan ROS üretimini indüklediği bildirilmiştir (161). *Helicobacter pylori* infeksiyonu gastrik inflamasyon ve karsinogenez sürecinde SSB ve DSB'lere neden olabilmektedir (167). *Helicobacter pylori* konakçı genomunda DNA kırıkları oluşturabilmektedir. ROS varlığında ya da yokluğunda meydana gelebilen  $\gamma$ -H2AX sentezi, DSB'lerin önemli bir göstergesidir ve *Helicobacter pylori*

infeksiyonunun bir sonucu olarak infekte gastrik mukoza hücrelerinde meydana gelebilmektedir (13). *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu tüm bu toksik etkiler sonucunda glandular atrofi, kronik inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, glandular epitel hücrelerde metaplazi ve gastrik kanser oluşum süreci başlamaktadır (19).

*Helicobacter pylori*'nin neden olduğu gastrik karsinogenez gelişimine dair pek çok çalışma olmasına rağmen; bugüne kadar yapılan çalışmalar bakterinin toksisite mekanizmalarına odaklanmaktan çok doğrudan infeksiyonun tedavisine yöneliktir (13). İnfeksiyon ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi değerlendiren ve oksidatif stresin tetiklediği DNA hasarının belirlendiği ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle DSB onarımı bozuk (genetik olarak) veya bir nedenle bozulmuş bireylerde (çevresel nedenler; örneğin UV maruziyeti, X-ışını maruziyeti; immün sistem bozuklukları, kanser, diyabet vb. durumlarda) *Helicobacter pylori*'nin neden olabileceği DNA hasarını sağlıklı bireylerle karşılaştırabilecek veriler yetersizdir. (13,19,158).

Sunulan tez çalışmasında, bir gastrik adenokarsinoma hücre hattı olan AGS hücreleri; VacA ve CagA pozitif standart *Helicobacter pylori* suşu (NCTC 11637) ile infekte edilmiştir. Ayrıca, çalışma gruplarına DNA onarım enzim inhibitörü Nu7441 eklenerek, DSB onarımı bozuk veya bir nedenle bozulmuş bireylerde *Helicobacter pylori*'nin neden olabileceği DNA hasarının sağlıklı bireylerde oluşabilecek hasarla karşılaştırılması hedeflenmiştir. Tez kapsamında *Helicobacter pylori* ile infeksiyon sonrasında hücrelerde oluşan sitotoksik, otofajik (Beclin1, LC3 ve p62 düzeylerinin belirlenmesi) ve apoptotik etkiler (kaspaz 3 ve 8 aktivitelerinin ölçümü) değerlendirilmiştir. Toksik etkilerin altında yatabileceği düşünülen olası mekanizmaların incelenmesi amacıyla oksidan/antioksidan statü parametreleri (antioksidan enzim aktiviteleri, GSH, TAOC, MDA, protein oksidasyonu, oksidatif DNA hasarı) kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

### **5.1. Sitopatolojik Değerlendirmeler**

Tez kapsamında yapılan ışık mikroskopisi ve elektron mikroskopisi incelemelerinde, kontrol grubunun belirgin çekirdekçik, ökromatik çekirdeklere sahip oldukları ve çekirdek/sitoplazma oranının çekirdek lehine olduğu, hücrelerde yer yer vakuollerin bulunduğu gözlenmiştir. HP+AGS grubunda AGS hücrelerinin

membranları üzerinde *Helicobacter pylori*'nin flagellaları gözlemiş olup, AGS hücrelerinin çevresinde hücre membranına tutulmuş halde ancak hücre içine alınmamış halde görülmüş olup bakterinin hücre içine invaze olmayan bir bakteri olduğunu doğrular yöndedir. AGS hücrelerinin çekirdeklerinin sağlam ancak çok sayıda vakuollerle dolu olduğu ve bu vakuollerin çekirdeği ittiği görülmüştür. AGS hücrelerinin sitoplazmasında gözlenen bu vakuollerin ve bazı hücrelerde gözlenen karyolizisin bakterinin VAcA toksinininden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. AGS+Nu7441 grubunda hücrelerin sitoplazmasında çok sayıda vakuol saptanmıştır ve yer yer dejenere hücrelere rastlanmıştır. Hücrelerde vakuol miktarının artışının ve dejenere organellerde artışın DNA onarımının Nu7441 ile inhibisyonuna sekonder olarak gelişebileceği şeklinde yorumlanmıştır. HP+Nu7441 grubunda hücre sayısında azalma ve varolan hücrelerin sitoplazmalarında bulunan vakuollerin çekirdekleri kenara ittiği görülmüştür. DNA onarım mekanizması inhibe olduğundan bakterinin sitotoksik etkilerinin daha belirgin olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir.

## 5.2. Hücre Canlılığı ve ROS

Tez kapsamında, *Helicobacter pylori*'ye maruziyetin ve aynı zamanda DSB onarım enzim inhibisyonunun hücre canlılığına ve ROS artışına olası etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda 1 canlı AGS hücresi başına kaç adet bakteri hücresinin tüm hücre canlılığında %30 ve %50 azalmaya neden olacağı belirlenmiştir. Bu nedenle tez kapsamında MOI ve IC terimleri benzer ifadeler olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda, MTT testinin sonucunda HP+Nu7441 çalışma grubunda IC50 değeri (MOI50) 194,44 bakteri/memel hücresi ve IC30 değeri 97 bakteri/memel hücresi olarak bulunurken, HP grubunda ise IC50 değeri 259 bakteri/memel hücresi, IC30 değeri ise 194 bakteri/memeli hücresi olarak belirlenmiştir. ROS üretimi açısından değerlendirildiğinde, ROS düzeylerinin çalışma gruplarında kontrol grubuna göre yaklaşık %20 civarında artışın meydana geldiği görülmüştür. Bu doğrultuda elde edilen bulgular *Helicobacter pylori*'ye maruziyetin hücre canlılığında azalmaya ve ROS artışına neden olduğunu doğrular niteliktedir.

Reaktif oksijen türlerinin üretimi oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biridir ve konu ile ilgili çok sayıda çalışmada ele alınan bir parametredir. Literatürde

*Helicobacter pylori* ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar *Helicobacter pylori*'ye maruziyetin hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu ve ROS üretimini artırdığı ve bu artışta kronik inflamasyonun neden olduğu sitokin salımının yanı sıra bakteri invazyonunun ve virülans faktörlerinin de etkili olduğu gösterilmiştir (19,82,92)

*Helicobacter pylori* ile ilgili literatürde farklı hücre hatlarında, insan biopsi örneklerinden alınan örneklerle ve hayvan deneylerinden alınan örneklerle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmalar değerlendirildiğinde farklı MOİ değerleri, inkübasyon süreleri, hücre hatları ve *in vivo* çalışmalardan kaynaklanan farklı sonuçların elde edildiği görülmektedir (11,133,219-221)

Ladeira ve ark. (2008)'nin 42'si *Helicobacter pylori* pozitif, 61 gastrik kanserli hastadan ve 21 sağlıklı gönüllüden aldıkları gastrik biopsi örnekleriyle) ve MTT yöntemleri ile yaptıkları ve hücre canlılığının değerlendirildiği bir çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif bireylerde gastrik hücrelerin canlılık oranı ortalaması %89 bulunmuştur (11). Fan ve ark.(1996)'nin yaptıkları çalışmada, *Helicobacter pylori*'nin gastrik epitelyal hücre siklusuna etki ederek hücre proliferasyonunu arttırdığı iddia edilmiştir. Bu çalışmada *Helicobacter pylori*'nin hücre kinetiğine ve canlılığına olan etkisinin araştırılması amacıyla, AGS hücre hattı kullanılmıştır. 6 farklı duodenal ülser veya gastrit hastasından elde edilen *Helicobacter pylori* suşları, AGS hücreleriyle 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda hücreler toplanarak canlılık oranları MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda kontrol gruplarına göre *Helicobacter pylori* ile infekte hücrelerde artış tespit edilmiştir. Ancak, bu çalışmada elde edilen *Helicobacter pylori* örneklerinin hücre canlılığında önemli rol oynayan üreaz, CagA ve VacA virülans faktörlerine sahip olup olmadığı bilinmemektedir (220). Ayrıca *Helicobacter pylori* ile infekte hücrelerde meydana gelen aşırı ROS üretiminin indüklediği apoptoza karşılık hücrelerde proliferasyonun indüklenmesi ve bu şekilde hücresel dengenin sağlanması da olasıdır (133,224).

Yapılan çalışmalar virülans faktörlerinin hücre canlılığında önemli rol oynadığını göstermiştir (121,226). Smoot ve ark. (1990) yaptıkları *in vitro* çalışmada *Helicobacter pylori*'nin salgıladığı üreazın hücre canlılığına olan etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, çalışma grupları *Helicobacter pylori*'nin yaşaması için optimal koşulları sağlayacak şekilde üreaz inhibe edilen üreaz negatif deney grubu ve üreaz pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. AGS hücreleri en son konsantrasyonu

$5 \times 10^6$  cfu/ml olacak şekilde *Helicobacter pylori* ile 2 saatlik, 24 saatlik ve 48 saatlik sürelerde inkübe edilmiş ve MTT yöntemi ile canlılıkları değerlendirilmiştir. Üreaz pozitif grupta 2 saat, 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon sonrası canlılık yüzdeleri sırasıyla; %11, %12 ve %9 iken üreaz negatif grupta %9, %8 ve %20 oranlarında tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda maruziyet süresi arttıkça üreazın neden olduğu amonyak oluşumunun hücrelerde sitotoksik etkiye neden olabileceği iddia edilmiştir (228).

Osbt ve ark. (2000)'nin yaptıkları çalışmada, HMO2 ve AGS hücreleri 20  $\mu\text{g/ml}$  ve 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlardaki *Helicobacter pylori* ekstratları ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında spektrofotometrik ölçümle değerlendirilmiş ve yapılan ölçümlerde ROS üretiminin kontrol grubuna göre ve doz bağımlı olarak arttığı bulunmuştur bulunmuştur (157).

Huang ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada AGS hücrelerine deney grubu olarak *Helicobacter pylori* 11638 (VagA ve CagA pozitif) ve *Helicobacter pylori* 11638M (CagA pozitif ve VagA negatif) suşlarını ve pozitif kontrol grubu olarak da hisrojen peroksite maruz kalan AGS hücrelerini kullanmışlardır. *Helicobacter pylori* suşlarından elde edilen ekstratlar 60  $\mu\text{g/ml}$ , 120  $\mu\text{g/ml}$ , 480  $\mu\text{g/ml}$  ve 969  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarda hazırlanarak 3 saatlik, 6 saatlik, 12 saatlik, 24 saatlik ve 48 saatlik sürelerde inkübe edilmiş ve ROS üretimi akış sitometrisi yöntemiyle ölçülmüştür. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki *Helicobacter pylori* suşunda da ROS seviyelerinin anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. Pozitif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ise, 480  $\mu\text{g/ml}$  ve 969  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarındaki *Helicobacter pylori* 11638M grubunun ve 240  $\mu\text{g/ml}$ , 480  $\mu\text{g/ml}$  ve 960  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarındaki *Helicobacter pylori* 11638 grubunun pozitif kontrol grubuna göre özellikle maruziyet süresine bağlı olarak çok daha yüksek oranlarda ROS üretimine neden oldukları bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Ayrıca, *Helicobacter pylori* 11638 ekstratları ile inkübe edilen hücreler tarafından üretilen ROS düzeylerinin aynı konsantrasyonlardaki *Helicobacter pylori* 11638M grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Çalışmada aynı zamanda hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla ATP düzeyleri ölçülmüş ve negatif ve pozitif gruplarda doz ve süreye bağlı olarak anlamlı derecede azalmalar tespit edilmiştir (172).



Davies ve ark. (1994)'nın yaptıkları çalışmada, 68'i *Helicobacter pylori* pozitif olan 110 antral biopsi örneğinde histolojik değişim ve ROS artışı arasındaki ilişki incelenmiştir. Yapılan histopatolojik incelemelerde görülen değişimler ile kemiluminisans metodu ile ölçülen ROS değerleri arasında korelasyon tespit edilmiş ve bu değerlerin *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda *Helicobacter pylori* negatif hastalara göre önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür. ROS üretimi nitro-mavi tetrazolyum boya (NBT) redüksiyon testiyle değerlendirilmiş ve kontrol hücrelerine göre *Helicobacter pylori* ATCC 43629 suşunda 5,2 kat artış görülürken, daha virülan olan *Helicobacter pylori* ATCC 60190 suşunda 6,4 kat artış tespit edilmiştir (172).

Smoot ve ark. (2000)'nin yaptıkları bir başka çalışmada AGS hücrelerinde CagA ve VacA virülans faktörlerinin neden olduğu ROS artışına paralel olarak hücre canlılığına değerlendirilmesi amaçlanmıştır. AGS hücreler, CagA pozitif ve CagA negatif bakteri suşları en son konsantrasyonu  $1 \times 10^7$  bakteri/ml olacak şekilde muamele edilmiştir. Ayrıca, AGS hücreleri VacA pozitif ve negatif bakteri suşlarından elde edilen bakteriyel proteinlere de (final konsantrasyonu 4mg/ml/ protein olacak şekilde) 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. *Helicobacter pylori*'nin tetiklediği ROS artışının değerlendirilmesi amacıyla, bir grup AGS hücreleri sadece ksantin oksidazla, bir grup AGS hücreleri sadece *Helicobacter pylori* ile ve bir grupta önce *Helicobacter pylori* ile ardından ksantin oksidaz ile muamele edilmiştir. Canlılık yüzdeleri ölçüldüğünde sadece ksantin oksidaz grubunda %83, ksantin oksidaz+*Helicobacter pylori* grubunda %73,7, sadece *Helicobacter pylori* eklenen grupta ise %39,5 bulunmuştur. VacA virülans faktörünün etkisinin de araştırıldığı çalışmada, hücre canlılığı AGS+ksantin oksidaz grubunda % 97,7; AGS+ksantin oksidaz+*Helicobacter pylori* VacA pozitif grubunda %63,5 ve AGS+ksantin oksidaz+*Helicobacter pylori* VacA negatif grubunda % 70,5 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda *Helicobacter pylori*'nin ROS oluşumunda virülans faktörleri arasında belirgin bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (221).

Drake ve ark. (1998)'nin yaptıkları bir çalışmada 77 *Helicobacter pylori* pozitif kronik gastrit, 53 normal biopsi örneği ve 31 aktif gastrit hastası olmak üzere 161 gastrik biopsi örneğinde ROS düzeyleri spektrofotometrik yöntemle değerlendirilmiştir. *Helicobacter pylori* pozitif kronik gastrit örneklerinde 23885 cpm/mg, aktif gastrit örneklerinde 1576 cpm/mg ve normal örneklerde 1210 cpm/mg

olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda *Helicobacter pylori* 'nin belirgin ROS üretimine neden olduğu iddia edilmiştir (219).

Jung ve arkadaşları(1998) 'nın yaptıkları benzer bir çalışmada da 380 gastrik biopsi örneği çalışılmıştır. 24 kontrol hastasından 8'inde, 161 gastrit hastasından 100'ünde ve 123 ülser hastasının 84'ünde *Helicobacter pylori* pozitif olarak belirlenmiştir. Spektrofotometri metoduyla ROS seviyeleri karşılaştırıldığında, *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde  $43,8 \pm 134,9$  cpm/ $\mu$ g ve *Helicobacter pylori* negatif örneklerde  $6,8 \pm 20,3$  cpm/ $\mu$ g olarak bulunmuştur (226). Papa ve ark. (2002)'nin yaptıkları benzer bir çalışmada da (2002) 40'ı *Helicobacter pylori* pozitif 60 hastadan alınan gastrik biopsi örneği yine spektrofotometri metoduyla çalışılmıştır. Çalışmanın sonunda *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde bulunan ROS seviyelerinin *Helicobacter pylori* negatif örneklere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (227).

Yapılan pek çok invitro çalışma *Helicobacter pylori* infeksiyonunun gastrik mukozada ROS'nin üretimini tetiklediği ve aynı zamanda hücre canlılığına da etki ettiğini göstermektedir. Tez kapsamında elde edilen bulgular bu hipotezi doğrular niteliktedir.

### 5.3. Oksidan/Antioksidan Parametreler Üzerine Etkiler

Hücre içinde oluşan yüksek düzeylerdeki ROS'dan hücre zarlarının ve organellerinin korunması GPx, SOD, CAT gibi antioksidan enzimleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Çalışmalar *Helicobacter pylori*'nin ürettiği bakteriyel toksinlerden ve infeksiyondan korunmak için gastrik hücrelerde bu enzimlerin ekspresyonlarında ve aktivitelerinde değişiklikler olabileceğini göstermiştir (230).

Antioksidan parametrelerde değişimler oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biri olup, konu ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. *Helicobacter pylori* infeksiyonunun gastrik mukozada serbest radikal artışına neden olduğu ve bu serbest radikal birikiminin antioksidan mekanizmaları etkileyebileceği bilinmektedir (231). Tez kapsamında *Helicobacter pylori*'ye maruziyette ve aynı zamanda DSB onarım enzim inhibitörü varlığına ve yokluğuna gözlenen serbest radikal artışına bağlı olarak antioksidan parametrelerin düzey veya aktivitelerindeki değişimlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular *Helicobacter*

*pylori*'ye maruziyetin oksidatif stres artışına paralel olarak antioksidan parametrelerde değişimlere neden olduğunu doğrular niteliktedir. Ayrıca DNA onarım enzim inhibitörü Nu7441 eklenen gruplardan elde edilen bulgular, DSB onarımı bozuk veya bir nedenle bozulmuş hücrelerde *Helicobacter pylori*'nin neden olabileceği oksidatif stresin sağlıklı hücrelere oranla çok daha ciddi düzeylerde olabileceğini desteklemektedir. İn vitro olarak elde edilen bu verilerin insanlara ekstrapolasyonu düşünülürse, DSB onarımı bozuk olan bireylerde de benzer durumların ortaya çıkması söz konusu olabilir.

Tez kapsamında, AGS hücrelerinde SOD aktivitesinde kontrol grubuna oranla Nu7441, HP ve HP+Nu7441 gruplarında önemli artışların meydana geldiği bulunmuştur. Bunun nedeni HP+Nu7441 özellikle *Helicobacter pylori* maruziyeti ile hücre içi süperoksit miktarlarının artışı ve bunu kompanse etmek için SOD aktivitesinin artışı olarak yorumlanabilir. Diğer taraftan, GPx aktivitesi incelendiğinde yine tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre GPx aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumda, *Helicobacter pylori*'nin hücre içinde süperoksit dışında hidrojen peroksit veya benzeri peroksit üretimi tetiklediği ve oluşan peroksit türevlerini ortadan kaldırmak için GPx aktivitesinin arttığı söylenebilir. Özellikle HP+Nu7441 grubunda HP grubuna göre GPx aktivitesinde görülen 2,9 katlık artışın Nu7441 varlığında onarılmayan DSB'lerin de GPx'in aktivitesini indüklediği şeklinde yorumlanabilir. Diğer taraftan, özellikle HP+Nu7441 grubunda görülen GSH artışı, bu grupta GPx aktivitesinin paralel olarak gerçekleşmektedir. TAOC miktarında HP ve HP+Nu7441 gruplarında görülen anlamlı düşüşlerin ise, gerek bakteriyel toksinler, gerekse infeksiyon nedeniyle hücrenin total oksidan indirgeme kapasitesindeki düşüşle bağlantılı olduğunu ifade etmek mümkündür.

Tez kapsamında değerlendirilen bir diğer antioksidan enzim olan CAT'ın aktivitesinin, hem HP hem de HP+Nu7441 gruplarında kontrole göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. HP grubu ile HP+Nu7441 grubu karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubunda CAT aktivitesinin yaklaşık 2,1 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda, *Helicobacter pylori* maruziyetinin AGS hücrelerinde yol açtığı hidrojen peroksit artışının GPx dışında CAT aktivitesini de kompensatör bir mekanizma olarak tetiklediği söylenebilir. Yine aşırı DSB varlığında, *Helicobacter pylori*'nin yol açtığı

oksidatif hasarın, özellikle de DNA oksidatif hasarının yüksek olmasının CAT aktivitesini indüklemesi olasıdır.

Tezde lipit peroksidasyon ve protein oksidasyon düzeyleri de değerlendirilmiştir. HP ve HP+Nu7441 gruplarında hem lipit peroksidasyon hem de protein karbonil düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Protein oksidasyonu lipit peroksidasyonu nedeniyle gerçekleşebileceği gibi bağımsız olarak da gerçekleşebilen bir durumdur. AGS hücrelerinde karbonil grup düzeylerinin lipit peroksidasyon ile paralel olarak arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun lipit peroksidasyon nedeniyle protein oksidasyonuna yol açtığı söylenebilir. Ancak, protein oksidasyonun en azından bir kısmının lipit peroksidasyondan bağımsız olarak da gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Literatürde *Helicobacter pylori* ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonuçları da *Helicobacter pylori*'ye maruziyetin oksidatif stres artışına yol açtığını işaret eder niteliktedir (219,223,226,231). Augusto ve ark. (2007)'nin yaptıkları bir çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif gastrik kanserli (n=10), kronik gastritli (n=20), gastrik ülserli (n=20) ve *Helicobacter pylori* negatif sağlıklı gönüllüden (n=10) alınan gastrik biopsi örneklerinde MnSOD, GPx ve CAT enzimlerinin ekspresyonları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre, kontrol grubunda bu antioksidan enzim düzeylerinin *Helicobacter pylori* pozitif olan hasta grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Enzim ekspresyonları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre *Helicobacter pylori* pozitif hasta grubunun MnSOD (p=0,033) ve GPx (p=0,0258) ekspresyonlarının oldukça düşük olduğu görülmüştür. Öte yandan CAT ekspresyon ve düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunamamıştır (230).

Smooth ve ark. (2000)'nin yaptıkları bir *in vitro* çalışmada ise, 24 saat *Helicobacter pylori* CagA pozitif ve negatif suşları ile infekte edilen AGS hücrelerinde CuZn-SOD, Mn-SOD ve total SOD düzeyleri ELISA sandviç yöntemi ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde total SOD düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla CagA pozitif grupta %156 oranında ve CagA negatif grupta %56 oranında artış gösterirken, Mn-SOD düzeyleri CagA pozitif grupta %71 ve CagA negatif grupta %62 oranında artış göstermiştir. Cu,Zn-SOD düzeylerinde ise belirgin bir fark tespit edilememiştir. Yine

aynı çalışmada, CAT ve GPx seviyelerine bakıldığında, CagA pozitif grupta CAT aktivitesinde %51 oranında ve GPx aktivitesinde %240 oranında bir artışın meydana geldiği, CagA negatif grupta CAT aktivitesinde orta derecede bir azalmanın ve GPx aktivitesinde ise küçük bir artışın meydana geldiği bulunmuştur (226).

Hagag ve ark. (2018)'nin *Helicobacter pylori* ile infekte 60 çocuktan aldıkları gastrik biopsi örnekleriyle yaptıkları bir çalışmada, oksidatif stres biyogöstergeleri olan MDA ve GSH düzeyleri ve SOD ve CAT aktiviteleri değerlendirilmiştir. GSH düzeyleri *Helicobacter pylori* pozitif grupta  $1,83 \pm 0,16$  nmol/g, kontrol grubunda  $2,44 \pm 0,07$  nmol/g olarak belirlenmiştir. MDA değerleri ise *Helicobacter pylori* pozitif grupta  $189,15 \pm 6,14$  nmol/g, kontrol grubunda  $166,21 \pm 3,13$  nmol/g olarak bulunmuştur. CAT aktiviteleri *Helicobacter pylori* pozitif grupta  $57,38 \pm 19,85$  U/g ve kontrol grubunda  $36,51 \pm 2,34$  U/g olarak ölçülmüştür. SOD aktiviteleri ise *Helicobacter pylori* pozitif grupta  $375,52 \pm 26,51$  U/g ve kontrol grubunda  $381,51 \pm 32,06$  U/g olarak tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda kronik *Helicobacter pylori* infeksiyonunun gastrik mukozada GSH düzeylerinde azalmaya yol açarken, MDA düzeylerinde ve SOD ve CAT aktivitelerinde belirgin artışa neden olduğu belirtilmiştir (230).

Tala ve ark. (2018)'nin 80 kronik gastrik hastasından aldıkları serum örnekleriyle yaptıkları çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif ve negatif gruplarda GPx aktiviteleri karşılaştırılmıştır. *Helicobacter pylori* pozitif grupta serum GPx aktivitesi 115 (86-167) U/g Hb ve negatif grupta 125,5 (96-192) U/g Hb olarak bulunmuştur ( $p=0.062$ ). Çalışmanın sonucunda *Helicobacter pylori* ile infekte hastalarda GPx aktivitesinin *Helicobacter pylori* negatif hastalara göre belirgin bir fark göstermemesine rağmen azalma eğiliminde olduğu belirtilmiştir (231).

Götz ve ark. (1996)'nin yaptıkları çalışmada *Helicobacter pylori* pozitif gastriti olan hastalardan ( $n=71$ ) ve sağlıklı gönüllülerden alınan gastrik biopsi örneklerinde MnSOD ve Cu,Zn-SOD enzim miktar ve aktiviteleri ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. *Helicobacter pylori* pozitif gastriti olan hastalarda MnSOD enzim miktarı ( $p<0.001$ ) ve aktivitesinin ( $p \leq 0.05$ ) sağlıklı gönüllülere göre yaklaşık 2 ila 3 kat arttığı; Cu,Zn-SOD enzim miktar ve aktivitesinde ise anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (232).

Drake ve ark. (1998)'nin yaptıkları çalışmada 77 *Helicobacter pylori* pozitif kronik gastrit, 53 normal biopsi örneği ve 31 aktif gastrit hastası olmak üzere 161 gastrik biopsi örneğinde MDA seviyeleri fluometrik yöntemle değerlendirilmiştir. MDA değerleri normal biopsi örneklerinde 78,9 nmol/g, aktif gastrit örneklerinde 88,6 nmol/g ve kronik *Helicobacter pylori* örneklerinde 112,3 nmol/g olarak bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, ROS düzeylerindeki yükselmeye paralel seyreden MDA artışının *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun indüklediği oksidatif stresten kaynaklanabileceği belirtilmiştir (219).

Ma ve ark. (2013)'nin yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* pozitif ve negatif gastrik kanserli hastalardan alınan serum örneklerinde protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu düzeyleri karşılaştırılarak gastrik kanser ile oksidatif stres arasındaki ilişki araştırılmıştır. MDA değerleri *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda  $5,20 \pm 2,18$  nmol/ml, *Helicobacter pylori* negatif hastalarda  $4,90 \pm 1,49$  nmol/ml olarak bulunurken ( $p > 0,05$ ), protein karbonil değerleri ise *Helicobacter pylori* pozitif hastalarda  $2,18 \pm 0,58$  nmol/ml, *Helicobacter pylori* negatif hastalarda  $2,13 \pm 0,81$  nmol/ml olarak bulunmuştur ( $p > 0,05$ ) (233)

Jung ve ark. (2001)'nin yaptıkları çalışmada 24 kontrol, 161 gastrit ve 123 ülser hastası olmak üzere, % 62'si *Helicobacter pylori* pozitif toplam 308 hastadan gastrik biopsi örneği çalışılmıştır. MDA düzeyleri, *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde  $157,0 \pm 96,2$  nmol/ $\mu$ g, *Helicobacter pylori* negatif örneklerde ise  $110,0 \pm 51,6$  nmol/ $\mu$ g olarak belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). GSH düzeyleri, *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde  $159,3 \pm 76,6$  nmol/ $\mu$ g, *Helicobacter pylori* negatif örneklerde  $212,3 \pm 1,4$  nmol/ $\mu$ g olarak bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Elde edilen veriler doğrultusunda *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun aşırı mukozal ROS üretimine yol açtığı, hücrel antioksidanları baskıladığı ve bu şekilde hücre membranı hasarını tetikleyerek gastrointestinal hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (229).

Santra ve ark. (2000)'nin yaptıkları çalışmada 34'ü *Helicobacter pylori* pozitif, 14'ü *Helicobacter pylori* negatif duodenal ülserli hastadan ve 10 sağlıklı gönüllüden olmak üzere toplam 58 serum ve gastrik biopsi örneğinde GSH ve MDA düzeyleri çalışılmıştır. Serum MDA düzeyleri *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde 930,2 nmol/dl, *Helicobacter pylori* negatif örneklerde 540,7 nmol/dl ve kontrol grubunda 232,5 nmol/dl olarak bulunmuştur. Dokudaki MDA düzeyleri ise *Helicobacter pylori*

pozitif örneklerde 163,1 nmol/100 mg, *Helicobacter pylori* negatif örneklerde 109,2 nmol/100 mg ve kontrol grubunda 25,8 nmol/100 mg olduğu tespit edilmiştir. GSH serum düzeyleri incelendiğinde; *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde 26,1 nmol/dl, *Helicobacter pylori* negatif örneklerde 26,9 nmol/dl ve kontrol grubunda 26,6 nmol/dl olarak, GSH doku düzeyleri ise *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde 91,7/100mg, *Helicobacter pylori* negatif örneklerde 147,3/100 mg ve kontrol grubunda 279,3/100 mg olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda *Helicobacter pylori* pozitif örneklerde görülen GSH düzeylerindeki azalmanın ve aynı zamanda MDA düzeylerindeki artışın *Helicobacter pylori* enfeksiyonu sürecinde oluşan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak meydana geldiği iddia edilmiştir (228). Farinati ve ark. (2003)'nın yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* pozitif ve *Helicobacter pylori* negatif kronik gastritli hastalardan alınan gastrik biopsi örneklerinde, TBARS düzeyleri karşılaştırıldığında *Helicobacter pylori* pozitif grupta TBARS değerlerinin anlamlı derecede arttığı ve bu artışın kronik gastritin derecesi ile de paralellik gösterdiği görülmüştür (133).

Demir ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *Helicobacter pylori* ile infekte 15'i peptik ülser, 14'ü gastrit ve 12'si sağlıklı kontrol grubundan alınan gastrik biopsi örneklerinde MDA ve GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *Helicobacter pylori* ile infekte hasta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; peptik ülserli hastalarda GSH doku düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük, MDA düzeyinin ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Gastritli hastalarda da aynı şekilde GSH doku düzeyinin düşük, MDA düzeyinin ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerden yola çıkarak, *Helicobacter pylori* pozitif peptik ülser ve gastritli hastalarda gastrik mukozal GSH düzeyindeki azalmanın ve lipid peroksidasyondaki artışın gastrik hücrelerde membran hasarına neden olan serbest radikal artışından kaynaklabileceği ifade edilmiştir (235).

*Helicobacter pylori*'nin neden olduğu oksidatif hasarlarından biri de protein hasarı olup literatürde bu konu ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Noyan ve arkadaşlarının yaptıkları in vitro çalışmada 30 *Helicobacter pylori* pozitif gastrik kanserli ve 30 *Helicobacter pylori* negatif gastrik kanserli hastadan alınan serum örnekleri AOPP, MPO ve CAT seviyeleri değerlendirilmiştir. 30 *Helicobacter pylori* pozitif gastrik kanserli grupta protein karbonil (AOPP) değerlerinin ( $p < 0,05$ ) kontrol

grubuna göre anlamlı derece arttığı görülürken, CAT ve MPO değerlerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (236).

Total antioksidan kapasite oksidatif stresin varlığını ve hücrelerin antioksidatif mekanizmalarını belirleyen bir parametredir. Literatürdeki çalışmalarda, tez kapsamında elde ettiğimiz bulgulara uyumlu olarak, *Helicobacter pylori*'nin indüklediği oksidatif strese bağlı olarak TAOC'da azalmalar labileceği gösterilmiştir. azalmaya neden olduğunu göstermektedir (233-237). Dulger ve ark. (2011)'nın yaptıkları in vitro çalışmada, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun oksidatif stres gelişimindeki etkisini araştırmak amacıyla 42 *Helicobacter pylori* pozitif ve 25 *Helicobacter pylori* negatif dispeptik sendromu olan hastadan alınan plazma örneklerinde total antioksidan statü, total oksidan statü ve oksidatif stres indeksi değerlendirilmiştir. Çalışmada aynı hasta grubuna takiben eradikasyon tedavisi uygulanmış ve aynı parametreler karşılaştırılmıştır. Elde sonuçlara göre *Helicobacter pylori* infeksiyonunun gastrik mukozada belirgin düzeyde TAOC düzeylerinde azalmaya, total oksidan kapasite ve oksidatif stres indeksinde artışa neden olduğu ve eradikasyon sonrasında bu parametrelerin normal düzeyelere döndüğü belirlenmiştir (233). Mutlu ve ark.(2013)'nın yaptıkları benzer bir çalışmada, larengofarengal reflüsü olan ve serolojik testlerle tespit edilen *Helicobacter pylori* IgG pozitif, *Helicobacter pylori* IgG negatif hastalarda ve sağlıklı gönüllülerde oksidatif stres varlığı karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Alınan serum örneklerinde TAOC, total oksidan seviye ve oksidatif stres indeksi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre; total oksidan seviyeleri ve oksidatif stres indeks değerleri *Helicobacter pylori* IgG pozitif grupta kontrol grubundan yaklaşık 3,5 kat ve *Helicobacter pylori* IgG negatif gruptan yaklaşık 2 kat yüksek olarak bulunmuştur. TAOC değerlerinin *Helicobacter pylori* IgG negatif grupta ve kontrol grubunda birbirine yakın değerlerde olduğu; *Helicobacter pylori* IgG pozitif grubunda ise bir miktar daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgular doğrultusunda, *Helicobacter pylori*'ye karşı IgG antikollarının gelişmesi sonucunda vücutta total oksidan seviye ve oksidatif stres indeksinde artışlar görülebileceği belirtilmiştir. Bu nedenlerle, IgG pozitif hastalarda gastrik dokuda hasar görülebileceği belirtilmiştir (234).



#### 5.4. Hücre Ölümü Mekanizmaları

Hücre ölümü ile hücre çoğalması arasındaki dengenin bozulması karsinogenez gelişiminde önemli bir mekanizma olup, bu dengenin korunmasında apoptozis, otofaji ve nekroz gibi pek çok mekanizma görev almaktadır (28,102,238).

Apoptoz, birçok dokuda olduğu gibi gastrointestinal sistemde de sağlıklı hücrelerin yaşamına devam etmesi ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması için önemli bir hücre ölümü mekanizmasıdır (28,102,238). *Helicobacter pylori*'nin indüklediği apoptozda pekçok faktör rol oynamaktadır. Bakterinin mide mukozasına adhezyonu sonucu, epitelyal hücreler tarafından ortama salgılanan IL-8'in lenfosit ve monosit salınımının uyarılması dolayısıyla sitokin salınımı yoluyla artan oksidatif stres ve takiben görülen hasarlı hücrelerin apoptoz yoluyla ortadan kaldırılması *Helicobacter pylori*'nin en önemli toksik etki mekanizmalarından biri olarak değerlendirilir. Ayrıca, bakteriyel lipopolisakkaritler ve  $\gamma$ -glutamiltransferaz gibi bakteriyel ürünler, üreaz, VacA ve CagA gibi bakteriyel toksinler gastrik epitelyal hücrelerin apoptoza gitmesinde önemli rol oynamaktadırlar (245-247).

Tez kapsamında, *Helicobacter pylori*'ye maruziyette ve aynı zamanda DNA onarım enzim inhibitörü varlığına ve/veya yokluğuna olası apoptotik ve otofajik hücre ölüm mekanizmalarında rol alan proteinlerin düzeylerinin değerlendirilmesi de amaçlanmıştır. Bu doğrultuda elde edilen bulgular *Helicobacter pylori*'ye maruziyetin apoptozu ve otofajiyi tetiklediğini niteliktedir. Ayrıca, DNA onarım enzim inhibitörü Nu7441 eklenen gruplardan elde edilen bulgular, DSB onarımı bozuk AGS hücrelerinde *Helicobacter pylori*'nin tetiklediği apoptoz ve otofajinin kontrol grubu hücrelere oranla çok daha ciddi düzeylerde olabileceğini desteklemektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kontrol grubuna oranla tüm çalışma gruplarında kaspaz 3 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Kaspaz 8 düzeyleri de tüm çalışma gruplarında kontrole göre artarken, bu artış sadece HP+Nu7441 grubuna kontrole göre anlamlı olarak belirlenmiştir. Literatürde *Helicobacter pylori*'nin apoptozu ve otofajiyi indüklediğine dair pek çok çalışma mevcuttur ve tez kapsamında elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (242-244).

Kim ve ark. (2007)'nin yaptıkları *in vitro* çalışmada, AGS hücrelerinde *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörlerinden biri olduğu düşünülen  $\gamma$ -glutamil

transferaz (GGT)'nin apoptotik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, DNA rekombinasyonu ile elde edilen rekombinant GGT ve mutant GGT enzimleri (kontrol grubu), AGS hücreleriyle artan doz ve sürelerde inkübe edilmiştir. GGT'nin hücre canlılığına olan etkisi MTT ve TUNEL metodu ile değerlendirilirken, apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivasyonları sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile değerlendirilmiştir. Çalışmada GGT'nin doz ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı MTT yöntemi ile gösterilirken; yapılan TUNEL analizlerinde, TUNEL pozitif hücrelerde GGT'nin DNA fragmentasyonlarına neden olduğu gözlenmiştir. Apoptotik aktivite incelendiğinde kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunda doz ve zamana bağlı olarak kontrol grubuna göre artış meydana gelmesine rağmen; kaspaz 8 aktivasyonunda kontrol grubuna göre belirgin bir fark olmadığı ve dolayısıyla GGT'nin intrinsik kaspaz yolağını aktive ettiği görülmüştür (138).

Ding ve ark. (2007)'nin yaptıkları bir *in vitro* çalışmada, apoptoz, DNA fragmentasyonu ve kaspaz aktivitesi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada KatoIII, NCI-N87 ve AGS hücre serileri ve CagA pozitif ve CagA negatif *Helicobacter pylori* suşları ile çalışılmıştır. Ayrıca, bakterinin oksidatif stres yoluyla tetiklediği apoptoz hidrojen peroksit maruziyeti ile de karşılaştırılmıştır. *Helicobacter pylori* suşlarının 400 µM konsantrasyondaki hidrojen peroksit ile kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonu ile ve DNA fragmentasyonu oluşumunda benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Çalışmada kontrol gruplarına göre artan ROS miktarı ile apoptoz parametrelerindeki artışın paralellik göstermesinden yola çıkarak, *Helicobacter pylori* infeksiyonun neden olduğu oksidatif stresin apoptozu tetiklediği iddia edilmiştir (248).

Ashktorab ve ark. (2008)'nin yaptıkları bir çalışmada, AGS hücre hattı *Helicobacter pylori* ile infekte edilmiştir. Kaspaz 3 düzeyleri Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında kaspaz 8 aktivitesi sadece 24 saatten fazla sürelerde *Helicobacter pylori* ile inkübe edilen AGS hücrelerinde tespit edilirken, kaspaz 3 aktivitesinin daha kısa inkübasyon sürelerinde bile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği görülmüştür (247).

Zhang ve ark. (2017)'nin SGC-7901 gastrik adenokarsinoma hücre serisi ve *Helicobacter pylori* NCTC 11637 suşları ile yaptıkları çalışmada kaspaz 3 ve kaspaz9 ekspresyonları Western blot ile değerlendirilirken, apoptotik indeks ise akış sitometrisi

ile ölçülmüştür. SGC-7901 gastrik adenokarsinoma hücrelerinin *Helicobacter pylori* ile 6 saat, 12 saat, 24 saat ve 48 saatlik inkübasyona göre apoptotik indeks sırasıyla  $6,30 \pm 0,40$ ,  $11,57 \pm 0,78$ ,  $8,63 \pm 0,67$  ve  $7,22 \pm 0,97$  olarak bulunmuştur. Çalışmada maruziyet süresine bağlı olarak kaspaz 3 ve 9 aktivitelerinin arttığı da gözlenmiştir (249).

Maeda ve ark. (2002)'nin yaptıkları bir çalışmada, MKN45 ve HeLa hücreleri farklı virülanslarda *Helicobacter pylori* suşlarının ile inkübe edilmiş ve bu suşların apoptotik etkileri çalışılmıştır. Kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 7 aktivasyonları PCR yöntemi ile incelendiğinde kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivasyonlarının kontrol grubuna göre özellikle VacA suşlarında belirgin derecede artış gösterdiği; ancak, kaspaz 8 aktivasyonunda anlamlı bir artışın olmadığı tespit edilmiştir. Kaspaz 8'in *Helicobacter pylori*'nin indüklediği apoptozda etkin rol almadığı iddia edilmiştir (250).

Potthoff ve ark. (2002)'nin yaptıkları *in vitro* çalışmada *Helicobacter pylori*'nin indüklediği gastrik epiteliyal hücre apoptozda görevli kaspazlardaki olası değişiklikler araştırılmıştır. Kaspaz protein ekspresyonlarını belirlemek için Western blot tekniği ile kullanılmıştır. AGS hücrelerinin *Helicobacter pylori* ile inkübasyonu sonucunda, DNA-fragmentasyonunda 3 kat artış, kaspaz 9 ekspresyonunda 4 kat, kaspaz 8 ekspresyonunda 2 kat, kaspaz 6 ekspresyonunda 2 kat ve kaspaz 3 ekspresyonunda 6 kat artış görülürken, kaspaz 2 ve kaspaz 7 ekspresyonlarında herhangi değişim belirlenmemiştir Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *Helicobacter pylori*'nin indüklediği apoptozun mitokondriyel yolla olduğu ve bu yolda sadece belirli kaspazların rol aldığı ifade edilmiştir ((251).

Yang ve ark. (2017) apoptozda görev alan en önemli kaspazlardan olan kaspaz 3'ün *Helicobacter pylori* infeksiyonunun indüklediği apoptozdaki rolünü araştırmışlardır. İnsan mukozal epiteliyal hücre serisi (GES-1), MOI100 olarak uygulanarak *Helicobacter pylori* virülan suşlarıyla infekte edilmiş ve apoptoz akış sitometrisi ile; kaspaz 3 ekspresyonu ise Western blot ile değerlendirilmiştir. Kaspaz 3 yarılanmasının 6 saatlik inkübasyon sonrasında önemli oranda arttığı gözlenmiştir (253).

Ashktorab ve ark. (2008)'nin yaptıkları çalışmada AGS hücreleri VacA pozitif *Helicobacter pylori* suşu ile 0 saat, 3 saat, 6 saat, ve 24 saatlik sürelerde inkübe edilmiş; sonrasında total protein, sitoplazmik, nüklear ve membran fraksiyonları

toplanmıştır. Western blot ile yapılan analizlerde *Helicobacter pylori*'nin kaspaz 8 aktivasyonunu maruziyet süresine bağlı olarak arttığı ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) yarıklanmasına neden olduğu tespit edilmiştir (247).

Jones ve ark. (1997) *Helicobacter pylori* pozitif primer gastrit, *Helicobacter pylori* negatif inflamatuvar gastrit ve normal biopsi örnekleriyle çalışmışlardır. Apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile incelenerek apoptotik indeksleri değerlendirilmiştir. Apoptotik hücrelerin apoptoza özgü olan DNA fragmentasyonları *Helicobacter pylori* pozitif primer gastrit ve *Helicobacter pylori* negatif inflamatuvar gastrit özellikle süperfasiyal mukozada görülürken; *Helicobacter pylori* pozitif grupta ayrıca lamina propiradaki lenf nodüllerinde de tespit edilmiştir. Epitelyal hücrelerde apoptotik indeks *Helicobacter pylori* pozitif grupta ( $120 \pm 10$ ) *Helicobacter pylori* negatif gruba ( $50 \pm 10$ ,  $p < 0.005$ ) ve kontrol grubuna ( $40 \pm 10$ ,  $p < 0.02$ ) göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (253).

Hasegawa ve ark. (2000)'nın yaptıkları bir çalışmada 37 *Helicobacter pylori* pozitif gastroduodenal ülserli hastadan ve 8 sağlıklı gönüllüden aldıkları gastrik biopsi örnekleri TUNEL metodu ile incelenmiştir. *Helicobacter pylori* pozitif grupta epitelyal hücrelerin erozyona uğradıkları, laminopropriada lenfosit, plazma hücresi ve nötrofil infiltrasyonunun meydana geldiği görülmüştür. Musinöz hücrelerde bazal vakuolizasyon ve kubbeleşme, intestinal dokuda ödemsal değişiklikler ve hafif fibroz tespit edilmiştir. DNA fargmentasyonu açısından incelendiğinde *Helicobacter pylori* pozitif hücreler ile kontrol grubu hücreleri arasında belirgin bir fark bulunamamıştır. Elektron mikroskopu incelemelerinde, *Helicobacter pylori* pozitif grupta musinöz hücrelerin yüzeyinde mikrovillüslerde kaybolma, hücre yoğunluğunda artış, nüklear membranda çentiklenme, vakuolizasyon ve endoplazmik retikulumda dilatasyon tespit edilmiştir. Ayrıca G-hücrelerinin sekretuvar granüllerinde elektron dansisitenin şeffaf olduğu görülmüştür. Lamina propria incelendiğinde *Helicobacter pylori* pozitif grupta inflamatuvar hücrelerde, fibroblastlarda ve düz kas hücrelerinde çeşitli aşamalarında apoptoza rastlanmış ve kontrol grubuna göre çok daha yoğun olarak meydana geldiği belirlenmiştir (254).

Moss ve ark. (1996)'nın yaptıkları bi çalışmada, 12 sağlıklı gönüllüden ve 16 *Helicobacter pylori* pozitif duodenal ülserli hastadan alınan gastrik biopsi örneğinde TUNEL yöntemi ile *Helicobacter pylori*'nin gastrik hücreler üzerindeki apoptotik

etkisi ve neden olduğu morfolojik değişiklikler incelemiştir. *Helicobacter pylori* pozitif ve kontrol grubunda pozitif olarak boyanan hücrelerin çoğunlukla gastrik glandların süperfasyal kısımlarında biriktiği (ortalama %2.9) belirlenirken, *Helicobacter pylori* pozitif duodenal ülserli grupta apoptotik hücrelerin sayısının daha yüksek olduğu ve apoptotic hücrelerin daha derin glandlarda buldukları tespit edilmiştir. Ortalama apoptotik indeks kontrol grubuna göre %14 artış göstermiştir (255).

Otofaji, kelime anlamı olarak “kendi kendini (auto) yeme (phagy)” anlamına gelir ve metabolizmanın düzenlenmesi, morfojeniz, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir yoldur (256-258). Yapılan çalışmalarda *Helicobacter pylori* infeksiyonunun neden olduğu ROS’un otofajiyi etkin şekilde indüklediği ve VacA’nın otofajide mekaniksel bir role sahip olduğunu belirtilmiştir 102

p62, LC-3 ve Beclin-1 otofajik proteinler olup, otofajik aktivitenin belirteçleridir. LC-3 ve Beclin-1 düzeylerinin otofajinin indüksiyonu ile arttıkları, p62 düzeylerinin ise azaldığı bilinmektedir (28). Otofajik aktivite açısından tez kapsamında yapılan çalışmalarda Beclin-1 düzeylerinin kontrol grubuna oranla HP ve HP+Nu7441 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur. Ayrıca, HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubundaki Beclin-1 düzeylerindeki artışın HP grubuna göre 2,34 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. LC3 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analizlerde, yine kontrol grubuna oranla HP ve HP+Nu7441 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar bulunmuştur. HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubundaki LC3 düzeylerindeki artışın HP grubuna göre 3,49 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Tez kapsamında p62 düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analizlerde kontrol grubuna oranla p62 düzeylerinde HP ve HP+Nu7441 gruplarında azalma tespit edilmiştir. HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında ise HP+Nu7441 grubunda p62 düzeylerinin HP grubuna göre %85,17 oranda daha düşük olduğu belirlenmiştir. Literatürde *Helicobacter pylori* infeksiyonunun otofajiyi indüklediğine dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar ile tez kapsamında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçların paralellik gösterdiği belirtilebilir.

Raju ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada VacA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte atipik glandular (AGC) hücrelerin de 2 saatlik, 6 saatlik ve 24 saatlik maruziyet sürelerine bağlı olarak p62 ve LC3 ekspresyonunun arttığı; konfokal mikroskopisi ile ve PCR ile gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada uzun süreli VacA pozitif *Helicobacter pylori* infeksiyonunun AGC hücrelerinde otofajik aktivitenin bozulmasına ve dolayısıyla hücrelerde ROS ve p62 birikimine neden olduğu tespit edilmiştir. Oofajinin AGC hücrelerinin VacA toksinine ilk cevapta indüklendiği. 24 saatlik inkübasyonu ardından hücreler transmisyon elektron mikroskopunda incelendiğinde, VacA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte grupta genişlemiş vakuolleşme alanlarının bulunduğu ve otofagozom oluşumdaki çeşitli aşamalarının yer aldığı gözlenmiştir. Erken dönemdeki otofagozomlar intakt organeller içermekte iken ileri dönemdeki otofagozomlarda bakteri degradasyonları dikkati çekmiştir (259).

Castaño-Rodríguez ve ark. (2015)'nin yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* ile infekte AGS hücrelerinde otofajide görevli proteinlerin ekspresyonlarında değişimler meydana geldiği ve bu değişimlerin *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörlerine göre de değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. AGS hücrelerinin; GC026 (CagA, CagE, Cagl, CagT, VacAs1m1, BabA, OipA, DupA ve SabA pozitif) suşu veya Hp26695 (CagA ve VacAs1m1) suşları ile inkübasyonlarının ardından RT-PCR ile yapılan gen analizlerinde, Beclin-1 proteinini kodlayan otofaji ve Beclin 1 regülatör 1 proteini (AMBRA1) ve BECN1 gen ekspresyonlarında downregülasyon oluşurken, LC-3 proteinini kodlayan MAP1LC3B geninde upregülasyon meydana geldiği görülmüştür. GC026 ile infekte grupta AMBRA1 gen ekspresyonunun downregülasyon oranları 0.47 kat ( $p < 0,007$ ) iken, Hp 26695 ile infekte olan hücrelerde 1,0534 kat ( $p < 0,9855$ ) olarak bulunmuştur. BECN1 geni downregülasyon oranları GC026 ile infekte grupta 0,5237 kat ( $p < 0,006$ ) iken, Hp26695 ile infekte grupta 0,9175 kat ( $p < 0,6143$ ) olarak tespit edilmiştir. LC-3 proteinini kodlayan MAP1LC3B gen ekspresyonunun upregülasyon oranları GC026 ile infekte grupta 1,8449 kat ( $p < 0,0376$ ) olarak ve Hp26695 ile infekte grupta ise 1,3835 kat ( $p < 0,0942$ ) olduğu görülmüştür (260).

Tsugawa ve ark. (2014)'nin yaptıkları bir araştırmada VacA virülans faktörünün otofajiyi indüklediği ve otofajik yolla degrade edildiği gösterilmiştir. AGS ve WT-A10 hücreleri VacA negatif, VacAs1m2 ve VacAs2m2 suşlarıyla MOI50

olacak şekilde 0 saat, 3 saat, 15 saat ve 24 saatlik maruziyet sürelerinde inkübe edilmelerinin ardından, floresans mikroskopunda ve elektron mikroskopunda incelenmiş ve PCR ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Çalışmaların sonucunda otofaji indüksiyonunun VacA'dan bağımsız olarak meydana gelmesine rağmen, LC3-I → LC3-II dönüşümünün arttığı ve buna paralel hücre içi VacA konsantrasyonlarının da azaldığı görülmüştür (261).

Wang ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada THP-1 insan monosit hücrelerine ekilen *Helicobacter pylori*'nin otofagozom oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin makrofaj hücrelerine ekilmesinden 12 saat sonra hücre içine fagosite olduğu çift membranlı otofajik veziküllerin oluştuğu görülmüştür. Konfokal mikroskopisi ile yapılan incelemede bakterini ilk 6 saatte daha çok sitoplazmada lokalize olduğu ancak 12 saatten itibaren sayılarının azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Yapılan ileri analizlerde sitoplazmada LC3-II proteininde artışın meydana geldiği ve LC-3 artışının en fazla 6 ve 12 saatlerde olduğu tespit edilmiştir (261).

### 5.5. DNA Hasarı

DNA oksidasyonunun başta baz oksidasyonu olmak üzere pek çok tipte DNA hasarına yol açtığı bilinmektedir. BER mekanizması başta 8-OHdG olmak üzere okside bazların temel onarım mekanizmasıdır (161). VagA, CagA gibi bakteriyel toksinler ve nötrofil infiltrasyonu mukozal hasarı ve ROS/NOS üretimi *Helicobacter pylori* infeksiyonunda genetik instabiliteye neden olabilmektedir. *Helicobacter pylori* infeksiyonu gastrik inflamasyon ve karsinogenez sürecinde SSB ve DSB kırıklarına yol açmaktadır. DSB en tehlikeli DNA hasar tipidir (167).

Tez kapsamında AGS hücrelerinin *Helicobacter pylori*'ye maruziyeti sonucu, hücrelerde olası DSB oluşumu  $\gamma$ -H2AX fosforilasyonunun belirlenmesi ile değerlendirilirken, DNA baz hasarı ve DNA onarım proteinlerinin sentezindeki olası değişiklikler 8-OHdG ve OOG1 düzeylerinin ölçümü ile değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen bulgular *Helicobacter pylori*'ye maruziyetin oksidatif stres artışına paralel olarak oksidatif DNA baz hasarına neden olduğunu doğrular niteliktedir. Ayrıca, DNA onarım enzim inhibitörü Nu7441 eklenen gruplardan elde edilen bulgular, DSB onarımı bozuk AGS hücrelerinde *Helicobacter pylori*'nin neden

olduğu DNA hasarının sağlıklı hücrelere oranla çok daha ciddi düzeylerde olabileceğini desteklemektedir.

8-OHdG düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analizlerde kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda 8-OHdG düzeylerinde artış bulunurken, diğer çalışma gruplarında önemli bir değişiklik görülmemiştir. OGG1 düzeylerinde ise, kontrol grubuna oranla Nu7441 grubunda ve HP+Nu7441 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir.  $\gamma$ -H2AX düzeylerinin belirlenmesi için yapılan analizlerde ise, kontrol grubuna göre HP+Nu7441 grubunda %27 artış tespit edilmiştir. Pan  $\gamma$ -H2AX düzeylerinde kontrol grubu ile çalışma grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Literatürde *Helicobacter pylori* infeksiyonunun DNA'da baz hasarına ve DSB'lere yol açtığına dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar tez kapsamında elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Arabski ve ark. (2005)'nin yaptıkları bir çalışmada 22 *Helicobacter pylori* infekte hasta ve 23 sağlıklı gönüllüden alınan gastrik biopsi örneğinde DNA hasarı Comet yöntemi ile incelenmiş ve infekte hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek DNA hasarının meydana geldiği gösterilmiştir ( $p < 0.005$ ) ((164)). Papa ve ark. (2002)'nin yaptıkları yukarıda da sözü edilen çalışmada 20'i *Helicobacter pylori* pozitif ve 10'u negatif olmak üzere 30 dispeptik hastadan alınan gastrik biopsi örneğinde 8-OHdG oluşumunu immünoperoksidaz tekniği ile araştırmışlardır. *Helicobacter pylori* pozitif örneklerin %70'inde yüksek oranlarda 8-OHdG oluşumu saptanırken, bu oran *Helicobacter pylori* negatif grupta %20 olarak bulunmuştur (132). Nishibayashi ve ark. (2003)'nin yaptıkları ve daha önce bahsedilen bir çalışmada, 145 *Helicobacter pylori* pozitif erken dönem gastrik kanserli ve 141 *Helicobacter pylori* pozitif; ancak malignitesi olmayan hastalardan alınan gastrik mukoza örneklerinde 8-OHdG düzeyleri HPLC ile ölçülmüştür. *Helicobacter pylori* pozitif gastrik kanserli hastalarda anlamlı derecede yüksek 8-OHdG düzeylerinin olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ) (165).

Ma ve ark. (2004)'nin yaptıkları bir çalışmada *Helicobacter pylori* pozitif ve negatif gastritli hastalardan midenin farklı bölgelerinden alınan gastrik biopsi örneklerinde 8-okzodG düzeyleri çalışılmıştır. İmmünohistokimyasal metodun kullanıldığı çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif grupta 8-okzodG düzeyleri korpus ve antrum bölgelerinde *Helicobacter pylori* negatif gruba göre anlamlı derecede



yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,001$ ) (166). Baik ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışmada (1996) ise, *Helicobacter pylori* pozitif ve negatif hastalardan elde edilen biyopsi örneklerinde 8-OHdG düzeyleri karşılaştırılmıştır. *Helicobacter pylori* pozitif örneklerin 8-OHdG DNA miktarı negatif örneklerden 2,3 kat daha yüksek bulunmuştur (160). Yeniova ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada *Helicobacter pylori* (CagA pozitif ve CagA negatif olarak) infekte dispeptik hastalarında serum 8-OHdG düzeyleri karşılaştırılmıştır. 8-OHdG serum düzeyleri *Helicobacter pylori* negatif grupta  $5,77\pm 1,35$  ng/ml, *Helicobacter pylori* pozitif/CagA negatif grupta  $5,43\pm 1,14$  ng/ml ve *Helicobacter pylori* pozitif/cagA pozitif grupta  $7,57\pm 1,25$  ng/ml ( $p=0,005$ ) olarak bulunmuştur (263). Ma ve ark. (2013)'nin yaptıkları ve daha önce sözü edilen çalışmada ise, gastrik kanserli ve sağlıklı gönüllü serum örneklerinde 8-OHdG düzeyleri sırasıyla  $16,34\pm 8,30$  ng/ml ve  $12,29\pm 5,72$  ng/ml ( $p<0,05$ ) olarak bulunmuştur (233). Pignatelli ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada 34 kronik atropik gastrit ve peptik ülser hastasından alınan gastrik biopsi örneklerin de tedavi öncesinde ve sonrasında 8-OHdG düzeyleri karşılaştırıldığında, *Helicobacter pylori* eradikasyonunun 8-OHdG düzeylerini %40 oranında azalttığı bulunmuştur (264). Katsurahara ve ark. (2017)'nin yaptıkları benzer bir çalışmada, *Helicobacter pylori* pozitif gastritli hastalarda eradikasyon öncesinde ve sonrasında alınan gastrik biopsi örneklerinde 8-OHdG düzeyleri karşılaştırılmıştır. 8-OHdG düzeyleri tedavi sonrasında korpusta ve antrumda %50 oranında azalmıştır ( $p<0,001$ ) (265). Farinati ve ark. (2003)'nin yaptıkları bir çalışmada, *Helicobacter pylori* negatif ve *Helicobacter pylori* pozitif (cagA negatif ve pozitif 2 ayrı grup halinde olmak üzere) gastrik atropili ve intestinal metaplazili hastadan alınan gastrik biopsi örneklerinde 8-OHdG düzeyleri HPLC ile ölçülerek karşılaştırılmıştır. Her iki grupta da 8-OHdG düzeylerinin CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile infekte hastalarda en yüksek olduğu görülmüştür ( $p=0.01$ ) (133).

Kidane ve ark. (2014)'nin yaptıkları ve daha öne sözü edilen çalışmada ise, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun oksidatif ve küçük baz hasarlarını indüklediği ve sonrasında da AP alanların artışına neden olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmada insan normal gastrik epitelyal hücreleri (GES-1) *Helicobacter pylori* ile 12 saat boyunca inkübe edilmiş, inkübasyonun sonunda hücre siklusunun tüm fazlarında özellikle G1 fazında  $\gamma$ -H2AX pozitif hücrelerinin yayıldığı gözlenmiştir. Buna ek olarak,

enfeksiyon sırasında genomik DNA'da yüksek oranda AP alanlarının oluştuğu ve yine genomik instabiliteye neden olan OGG1'in yüksek oranda eksprese edildiği tespit edilmiştir (175).

Koeppel ve ark. (2015)'nin *Helicobacter pylori* AGS ve MKN74 oluşan hücrelerinde  $\gamma$ -H2AX düzeyleri araştırılmıştır. İnkübasyondan 6 saat sonra DSB'lerin akümülyasyon düzeylerinin iyonize radyasyon ile 18 saat boyunca maruziyet sonucunda ulaşılan DSB akümülyasyon düzeyleri ile benzer seviyede olduğu gözlenmiştir. Çalışmada Comet yöntemi ile AGS ve MKN74 hücreleri arasındaki DNA hasarı karşılaştırılmış ve AGS hücrelerinde inkübasyonun 6. saatinde DNA hasarının dikkat çekici düzeylere ulaştığı; MKN74 hücrelerinde ise benzer düzeye 18. saatte ulaşılabilirdiği belirtilmiştir. Çalışmada aynı zamanda *Helicobacter pylori*'nin hücre siklusu üzerine olan etkisi de araştırılmış ve *Helicobacter pylori*'nin hücre siklusunu G1/S fazında durdurduğu bildirilmiştir (266).

Hanada ve arkadaşlarının *Helicobacter pylori*'nin DNA hasarı ile 2014 yılında ilgili yaptıkları çalışmalarda *Helicobacter pylori* ile enfekte gastrik biopsi örnekleri incelendiğinde  $\gamma$ H2AX akümülyasyonu ile birlikte DNA DSB oluşumunu ve ATM aktivasyonunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarda CagA pozitif ve CagA negatif *Helicobacter pylori* ile enfekte gruplar da karşılaştırılmış ve her iki grupta da kromozom instabilitesinin meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca, CagA pozitif *Helicobacter pylori* ile enfekte bireylerin CagA negatif *Helicobacter pylori* ile enfekte bireylere göre 2 kat daha fazla gastrik kanser gelişme riskine sahip oldukları belirtilmiştir (12,174). *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ve DNA hasarı üzerindeki etkisi üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun konak hücrelerin genomik disintegrasyonuna ve DSB oluşumuna yol açtığı tespit edilmiştir. Primer ve transforme fare ve insan epitelyal ve mezenşimal hücrelerle yapılan bu deneylerde 6 saatlik inkübasyonun ardından DNA fragmantasyonu ve DSB oluşumunun doz ve süre bağımlı olarak arttığı ve GSH tüketiminde artış olduğu gösterilmiştir (13).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında AGS hücre hattında *Helicobacter pylori*'ye maruziyette ve ayrıca DSB onarım enzim inhibisyonunda olası toksik etkiler değerlendirilmiştir. Değerlendirme kapsamında sitotoksisite, oksidatif stres, antioksidan statüdeki değişiklikler, DNA hasarı, otofajik ve apoptotik değişiklikler ve bunlara paralel hücre morfolojisindeki değişiklikler yer almaktadır.

1. AGS hücrelerinde belirgin çekirdekçik, ökromatik ve büyük çekirdekler gözlenmiştir. Çekirdek sitoplazma oranı çekirdek lehine bulunmuştur. Hücrelerde yer yer küçük vakuoller gözlenmiştir. *Helicobacter pylori* ile inkübe edilen AGS hücre hattına ait hücrelerin membranları üzerinde *Helicobacter pylori*'nin flagelları izlenmiştir. Hücrelerin sitoplazmasında vakuoller gözlenmiştir. Nu7441 ile inkübe edilen AGS hücrelerinin çekirdeklerinin ve hücre membranının sağlam olduğu; ancak sitoplazmanın çok sayıda vakuolle dolu olduğu ve bu vakuoller ile çekirdeğin kenara itildiği gözlenmiştir. *Helicobacter pylori* ve Nu7441 ile inkübe edilen grupta AGS hücrelerinin membranı *Helicobacter pylori* çevresinde flagellalar ile çevrede çubuk şekilli *Helicobacter pylori* kesitleri gözlenmiştir. Bu grupta mide adenokarsinom hücre sayısının oldukça azaldığı; var olan hücrelerin sitoplazmasının vakuoller ile dolu olduğu belirlenmiştir.
2. Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi ile *Helicobacter pylori*'nin IC<sub>30</sub> ve IC<sub>50</sub> değerleri HP ve HP+Nu7441 grupları için hesaplanmıştır. HP grubunda IC<sub>30</sub> değeri 142,3 IC<sub>50</sub> değeri 259 olarak bulunurken, HP+Nu7441 grubunda IC<sub>30</sub> 97,3 ve IC<sub>50</sub> değeri 194 olarak bulunmuştur. HP grubu IC<sub>30</sub> değeri için MOİ 142 değerinde ve HP+Nu7441 grubu IC<sub>30</sub> değeri için MOİ 97 değerinde çalışılmıştır.
3. ROS düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Kontrol+Nu7741 grubunda %20,37, HP grubunda % 20,83 ve Nu7741+HP grubunda %20,44 oranlarında artış tespit edilmiş olup, tüm bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
4. Tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre GPx aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Bu artış kontrole göre Nu7441 grubunda %160, HP grubunda %179, HP+Nu7441 grubunda ise %190 olarak

belirlenmiştir. HP+Nu7441 grubu ile HP grubu karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubunda HP grubuna göre 2,90 kat daha yüksek GPx aktivitesi belirlenmiştir.

5. Kontrol grubunda bulunan örneklerde CAT aktivitesi  $26,10 \pm 2,00$  nmol/min/protein, Nu7441 grubunda  $21,74 \pm 2,20$  nmol/min/protein, HP grubunda  $40,27 \pm 7,06$  nmol/min/protein ve Nu744+HP grubunda  $83,79 \pm 12,12$  nmol/min/protein olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla HP (%85) ve HP+Nu7441 (%108) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir. HP grubu ile HP+Nu7441 grubu karşılaştırıldığında ise, HP+Nu7441 grubunda CAT aktivitesinin yaklaşık 2,1 kat oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir.
6. SOD aktivitesinde kontrol grubuna oranla Nu7441 grubunda %136,31 (2,36 kat), HP grubunda %279,95 (3,8 kat) ve HP+Nu7441 grubunda %315,48'lik (4,15 kat) bir artış meydana gelmiş olup tüm çalışma gruplarındaki artış istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur.
7. Total GSH düzeylerinde kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda anlamlı olmaya bir artış (%77,54) tespit edilirken, diğer çalışma gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.
8. Kontrol grubuna oranla HP (%95) ve HP+ Nu7441 (%428, yaklaşık 5,28 kat) gruplarında TBARS düzeylerinin anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur.
9. Kontrol grubuna oranla tüm çalışma gruplarında protein karbonil düzeyleri istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu artışlar Nu7441 grubunda %46,74, HP grubunda %194,88 (2,95 kat) ve HP+Nu7441 grubunda ise %362 (4,62 kat) olarak belirlenmiştir. HP ve HP+Nu7441 grubu karşılaştırıldığında HP+Nu7441 grubunda, HP grubuna göre protein karbonil düzeylerinde %56,70 oranında daha fazla artış meydana geldiği tespit edilmiştir.
10. Kontrol grubuna oranla HP (%70,34) ve HP+Nu7441 (%40,31) gruplarında TAOC düzeylerinin azaldığı görülmüş ve bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

11. Kontrol grubuna oranla tüm çalışma gruplarında kaspaz 3 düzeyleri istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu artış Nu7441 grubunda %142 (2,42 kat), HP grubunda %196 (2,96 kat) ve HP+Nu7441 grubunda %366 (4,66 kat) olarak belirlenmiştir.
12. Kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda kaspaz 8 düzeyleri istatistiksel olarak farklı ve anlamlı bulunmuştur (%186,68, 2,86 kat,  $p<0,05$ ). Nu7441 (%53,54) ve HP (%57,74) gruplarında isese anlamlı bulunmayan artışlar belirlenmiştir.
13. Kontrol grubuna oranla HP+Nu7441 grubunda 8-OHdG düzeylerinde artış bulunmuştur (56 kat,  $p<0,05$ ). Diğer çalışma gruplarında önemli bir değişiklik görülmemiştir.
14. OGG1 düzeylerinde kontrol grubuna göre Nu7441 grubunda 20,62 kat ve HP+Nu7441 grubunda ise 29,53 kat artış görülmüştür ve her iki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).
15.  $\gamma$ -H2AX düzeylerinde kontrol grubuna göre HP +Nu7441 grubunda %27'lik anlamlı bir artış tespit edilmiştir. HP grubunda ise %15,4'lük bir artış gözlenmiştir; ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır. Pan  $\gamma$ -H2AX düzeylerinde kontrol grubu ile Nu7441 ve HP+Nu7441 grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. HP grubunda görülen %15'lik artış da istatistiksel olarak anlamlı değildir.
16. Kontrol grubuna oranla HP (%110, 2,1 kat) ve HP+Nu7441 (%392, 4,93 kat) gruplarında Beclin-1 düzeylerinde artış tespit edilmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubundaki Beclin-1 düzeylerindeki artışın HP grubuna göre 2,34 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.
17. LC3 düzeyleri kontrol grubuna oranla HP (3,35 kat) ve HP+Nu7441 (11,68 kat) gruplarında artış tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. HP ve HP+Nu7441 grupları karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubundaki LC3 düzeylerindeki artışın HP grubuna göre 3,49 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.
18. Kontrol grubuna oranla p62 düzeyleri HP (%35,92) ve HP+Nu7441 (%90,50) gruplarında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. HP ve HP+Nu7441 grupları

karşılaştırıldığında, HP+Nu7441 grubunda p62 düzeylerinin HP grubuna göre %85,17 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, *Helicobacter pylori*'nin AGS hücre hattında sitotoksik olduğu, ROS üretimini arttırdığı, hücre için oksidan/antioksidan statü değişikliklerine yol açtığı ve hücre ölümünü tetiklediği söylenebilir. Bakterinin neden olduğu tüm bu değişikliklerin özellikle Nu7441 varlığında daha belirgin bir şekilde ortaya çıkması, DSB onarımı bozuk hücrelerin bakterinin oluşturduğu toksisiteye daha duyarlı olmasından kaynakladığı söylenebilir. Bu durum insanlara ekstrapole edilirse, DSB onarımı konjenital olarak bozuk olan veya çevresel ve/veya patolojik nedenlerle bozulan bireylerin bakterinin istenmeyen etkilerinden daha fazla etkileneceği ifade edilebilir. Özellikle SSB ve DSB onarımı bozuk bireylerde veya farklı maruziyetleri veya patolojileri olan kişilerde *Helicobacter pylori*'nin çok daha belirgin toksisiteye neden olacağı belirtilebilir. Ancak, bu konuda özellikle daha çok sayıda *in vivo* çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmaların özellikle *Helicobacter pylori*, DNA hasarı ve hücre ölüm mekanizmalarına yoğunlaşması gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Pálmai-Pallag T, Bachrati CZ. Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. *Microbes Infect.* 2014;16(10):822-32.
2. Kawanishi S, Hiraku Y. Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):1047-58.
3. IARC 2003.
4. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem.* 2006;387(4):365-72.
5. Mager DL. Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *J Transl Med.* 2006;4:14.
6. Weitzman MD, Weitzman JB. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):283-94.
7. Correa P. Bacterial infections as a cause of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(7):E3.
8. Nishizawa T, Suzuki H. Gastric Carcinogenesis and Underlying Molecular Mechanisms: *Helicobacter pylori* and Novel Targeted Therapy. *Biomed Res Int.* 2015;794378.
9. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992;52(24):6735-40.
10. Zhang XY, Zhang PY, Aboul-Soud MA. From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori*. *Oncol Lett.* 2017;13(2):543-548.
11. Ladeira MS, Bueno RC, Dos Santos BF, Pinto CL, Prado RP, Silveira MG, Rodrigues MA, Bartchewsky W Jr, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML, Salvadori DM. Relationship among oxidative DNA damage, gastric mucosal density and the relevance of cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci.* 2008;53(1):248-55.
12. Hanada K, Yamaoka Y. Genetic battle between *Helicobacter pylori* and humans. The mechanism underlying homologous recombination in bacteria, which can infect human cells. *Microbes Infect.* 2014;16(10):833-9
13. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M, Kalali B, Gerhard M, Sartori AA, Lopes M, Müller A. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(36):14944-9.
14. Machado AM, Figueiredo C, Touati E, Máximo V, Sousa S, Michel V, Carneiro F, Nielsen FC, Seruca R, Rasmussen LJ. *Helicobacter pylori* infection

- induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res.* 2009;15(9):2995-3002
15. Shirin H, Pinto JT, Liu LU, Merzianu M, Sordillo EM, Moss SF. *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. *Cancer Lett.* 2001;164(2):127-33
  16. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clin Infect Dis.* 1992 ;15(3):386-91.
  17. Neelapu NRR ., Nammi D, Pasupuleti ACM, Surekka C. *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation, ulcer, and cancer: a pathogenesis perspective. *Int J Inflamm Cancer Integ Ther.* 2014;1:1000113.
  18. [www.depositphotos.com.tr](http://www.depositphotos.com.tr).
  19. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):449-90.
  20. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Dis Model Mech.* 2017;10(2):89-104.
  21. Kim SS, Ruiz VE., Carroll JD, Moss SF. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett.* 2011;305(2):228-38.
  22. Junaid M, Linn AK, Javadi MB, Al-Gubare S, Ali N, Katzenmeier G. Vacuolating cytotoxin A (VacA) - A multi-talented pore-forming toxin from *Helicobacter pylori*. *Toxicon.* 2016;118:27-35.
  23. de Sablet T, Piazuolo MB, Shaffer CL, Schneider BG, Asim M, Chaturvedi R, Bravo LE, Sicinski LA, Delgado AG, Mera RM, Israel DA, Romero-Gallo J, Peek RM Jr, Cover TL, Correa P, Wilson KT. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut.* 2011;60(9):1189-95.
  24. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017;153(2):420-429.
  25. Montano V, Didelot X, Foll M, Linz B, Reinhardt R, Suerbaum S, Moodley Y, Jensen JD. Worldwide Population Structure, Long-Term Demography, and Local Adaptation of *Helicobacter pylori*. *Genetics.* 2015;200(3):947-63.
  26. Moss SF. The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016;3(2):183-191.
  27. Zarrilli R, Tuccillo C, Santangelo M, Nardone G, Romano M. Increased COX-2, but not COX-1, mRNA expression in *Helicobacter pylori* gastritis. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(11):3376-8.
  28. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991; 281(1-2):9-19.



29. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *International journal of food science&tecnology*.2001. 36(7):703-25.
30. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*.2002; 82(1):47-95.
31. Seaver LC, Imlay JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J.Biol Che*. 2004; 279(47):4872-50
32. Timbrell JA. *Principles of Biochemical Toxicology*.4th.edition. London: Informa Healthcare.2000.
33. Valko M, Rhodes C, Maoncol J, Izakovic M, Manzur M. Free radicals, metals and antioksidants in oksidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*.2006;160(1):1-40
34. Dabrowski JM. Chapter Nine-Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy; Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In: van Eldik R, Hubbard CD, editors. *ASdvances in Inorganic Chemistry*. 70: Academic Press; 2017;p.343-94.
35. Buettner GR, Schafer FQ. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology*. 2000; 62(4):234.
36. Sandström J, Nilsson P, Karlson K, Marklund SL. 10 fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *Journl of Biological Chemşistry*. 1994;269(29):19163-6
37. Mates JM, Perez- Gomez C, DeCastro IN. Antioxidant Enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603. Imlay JA. Patways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57(1):395-418.
38. Herbertte S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J*. 2007; 274(9):2163-80
39. Ialongo C. Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva. *Clin Biochem*. 2017;50(6):356-63.
40. Dringen R. Metabolism and functions of Glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*.2000;62(6):649-71
41. Meister A, Anderson ME. Glutathione .*Ann.Rev.Biochem*.1983;52:711-60
42. Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*. 2009; 16(10):1303-14.
43. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*. 1990;407-21
44. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(9):1482-95
45. Barrea G. Oxidative Stress and Lipit Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*.2012; 137289

46. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(7):995-1014.
47. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. *Free radical biology and medicine.*2001;31(11):1287-312.)
48. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in enzymology.* 1999;156-66.
49. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-9
50. Ji J, Zhang Y, Redon CE, Reinhold WC, Chen AP, Fogli LK, Holbeck SL, Parchment RE, Hollingshead M, Tomaszewski JE, Dudon Q, Pommier Y, Doroshow JH, Bonner WM. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. 2017;12(2):e0171582.
51. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516
52. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005; 37(11):719-27.
53. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;682:3-13
54. Salgame P, Varadhachary AS, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(3):680-1.
55. Oberhaus SM. TUNEL and immunofluorescence double-labeling assay for apoptotic cells with specific antigen(s). *Methods Mol Biol.* 2003;218:85-96.
56. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):460-73.
57. Greenfield LK, Jones NL. Modulation of autophagy by *Helicobacter pylori* and its role in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol.* 2013;21(11):602-12.
58. Anding AL, Baehrecke EH. Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Curr Top Dev Biol.* 2015;114: 67-91.
59. Cao Y, Luo Y, Zou J, Ouyang J, Cai Z, Zeng X, Ling H, Zeng T. Autophagy and its role in gastric cancer. *Clin Chim Acta.* 2019;489:10-20.
60. Zhang J. Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists- mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol.* 2015;4:242-59.
61. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;335:1-32.

62. Junaid M., 2016,Zhang J.,2015, Dikic I.,2010). Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res.* 2010; 70(9):3431-4.
63. Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res.* 2010;.70(9):3431-4
64. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J.* 2002;368(Pt 1):121-9.
65. van Vliet AH, Kuipers EJ, Waidner B, Davies BJ, de Vries N, Penn CW, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Bereswill S, Kusters JG. Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun.* 2001;69(8):4891-7.
66. Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C,Suerbaum S. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(14):5024-9.
67. Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (*Helicobacter Pylori* 0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol.* 2006;188(7):2656-65.
68. Lowenthal AC, Hill M, Sycuro LK, Mehmood K, Salama NR, Ottemann KM. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* flagellar switch proteins. *J Bacteriol.* 2009;191(23):7147-56.
69. Bauerfeind P, Wirth helicobacter pylori. [Peptic ulcer, *Helicobacter pylori*]. *Ther Umsch.* 1997;54(11):624-8.
70. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis.* 1990;161(4):626-33.
71. Bode G, Malfertheiner P, Lehnhardt G, Nilius M, Ditschuneit H. Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. *Med Microbiol Immunol.* 1993;182(5):233-42.
72. Krishnamurthy P, Parlow M, Zitzer JB, Vakil NB, Mobley HL, Levy M, Phadnis SH, Dunn BE. *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect Immun.* 1998;66(11):5060-6.
73. Rektorschek M, Buhmann A, Weeks D, Schwan D, Bensch KW, Eskandari S, Scott D, Sachs G, Melchers K. Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Mol Microbiol.* 2000;36(1):141-52.
74. Kuwahara H, Miyamoto Y, Akaike T, Kubota T, Sawa T, Okamoto S, Maeda H. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxyntirite via carbon dioxide production. *Infect Immun.* 2000;68(8):4378-83.
75. Sipponen P. Gastric cancer--a long-term consequence of *Helicobacter pylori* infection? *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1994;201:24-7. Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C,Suerbaum S. The

- spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(14):5024-9.
76. Kokoska ER, Kauffman GL Jr. *Helicobacter pylori* and the gastroduodenal mucosa. Surgery. 2001;130(1):13-6.
  77. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, Solcia E. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2007;132(3):1009-23.
  78. Stephanie E. Morales-Guerrero, Eduardo Mucito-Varela, Germán Rubén Aguilar-Gutiérrez, Yolanda Lopez-Vidal and Gonzalo Castillo-Rojas The Role of CagA Protein Signaling in Gastric Carcinogenesis. ISBN: 978-953-51-0907-5 Copyright year: 2013. Current Topics in Gastritis.
  79. Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Banks D, Wang T, Hong W, Blanke SR, Colombo MI, Jones NL. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. Infect Immun. 2006 ;74 (12):6599-614.
  80. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 2008;134(1):306-23.
  81. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev. 2010;23(4):713-39.
  82. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J. 2016;39(1):14-23.
  83. Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. Toxicol. 2003;42(6):601-11.
  84. Gangwer KA, Mushrush DJ, Stauff DL, Spiller B, McClain MS, Cover TL, Lacy DB. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(41):16293-8.
  85. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. Annu Rev Pathol. 2006;1:63-96.
  86. Boquet P, Ricci V. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. Trends Microbiol. 2012;20(4):165-74.
  87. Rassow J, Meinecke M. *Helicobacter pylori* VacA: a new perspective on an invasive chloride channel. Microbes Infect. 2012;14(12):1026-33.
  88. Abdi E, Latifi-Navid S, Latifi-Navid H, Safarnejad B. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin genotypes and preneoplastic lesions or gastric cancer risk: a meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol. 2016;31(4):734-44. (48)
  89. Miftahussurur M, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. Expert Rev Mol Med. 2017;19:e4.
  90. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol. 2005:320-32.

91. Posselt G, Backert S, Wessler S. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal*. 2013;11:77.
92. Kimura M, Goto S, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Hirayama T, Kondo T. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog*. 1999;26(1):45-52.
93. Szabò I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J*. 1999;18(20):5517-27.
94. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):211-6.
95. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004;306(5698):990-5.
96. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
97. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124-31.
98. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. 2007;9(10):1102-9.
99. Qian HR, Yang Y. Functional role of autophagy in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(14):17641-51.
100. Raju D, Hussey S, Ang M, Terebiznik MR, Sibony M, Galindo-Mata E, Gupta V, Blanke SR, Delgado A, Romero-Gallo J, Ramjeet MS, Mascarenhas H, Peek RM, Correa P, Streutker C, Hold G, Kunstmann E, Yoshimori T, Silverberg MS, Girardin SE, Philpott DJ, El Omar E, Jones NL. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1160-71.
101. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016;21:29.
102. Greenfield LK, Jones NL. Modulation of autophagy by *Helicobacter pylori* and its role in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol*. 2013;21(11):602-12.
103. Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2009;282(1):1-8.
104. Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*. 1997;113(6):1836-47.
105. Foegeding NJ, Caston RR, McClain MS, Ohi MD, Cover TL. An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. *Toxins (Basel)*. 2016;8(6).

106. Ashktorab H, Frank S, Khaled AR, Durum SK, Kifle B, Smoot DT. Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori*. *Gut*. 2004;53(6):805-13.
107. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol*. 1998;36(4):944-8.
108. Kim IJ, Blanke SR. Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:37.
109. Galmiche A, Rassow J. Targeting of *Helicobacter pylori* VacA to mitochondria. *Gut Microbes*. 2010;1(6):392-5.
110. Murphy G, Thornton J, McManus R, Swan N, Ryan B, Hughes DJ, O'Morain CA, O'Sullivan M. Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory-related genes IL-1B, IL-1RN, IL-10, TNF and TLR4. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(6):630-5.
111. Butcher LD, den Hartog G, Ernst PB, Crowe SE. Oxidative Stress Resulting From *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3(3):316-322.
112. McClain MS, Beckett AC, Cover TL. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins (Basel)*. 2017;9(10).
113. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elia MM, Telford JL, Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med*. 2003;198(12):1887-97.
114. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003;301(5636):1099-102.
115. Hatakeyama M. [*Helicobacter pylori* oncoprotein CagA and bacterial EPIYA effector family]. *Seikagaku*. 2014;86(6):744-54.
116. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):306-16.
117. Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(4):196-219.
118. Hatakeyama M. A Sour Relationship between BabA and Lewis b. *Cell Host Microbe*. 2017;21(3):318-320.
119. Bridge DR, Merrell DS. Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins and disease. *Gut Microbes*. 2013;4(2):101-17.
120. Backert S., 2004 Backert S, Schwarz T, Miehle S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, Gerhard M, Goebel UB, Lehn N, Koenig W, Meyer TF. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from

- patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun.* 2004;72(2):1043-56.
121. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 2014;345(2):196-202.
  122. Hatakeyama M. Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene.* 2008;27(55):7047-54.
  123. Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(1):30-7.
  124. Zhong Q, Shao S, Mu R, Wang H, Huang S, Han J, Huang H, Tian S. Characterization of peptidoglycan hydrolase in Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Biol Rep.* 2011;38(1):503-9.
  125. Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncol.* 2014;10(8):1487-500.
  126. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* causes gastric cancer by hijacking cell growth signaling. *Discov Med.* 2004;4(24):476-81(a)
  127. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(9):688-94.
  128. Tohidpour A. CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog.* 2016;93:44-55
  129. Suzuki M, Tanaka S, Suzuki K, Kitahora T, Masaoka T, Suzuki H, Hibi T. Persistent oxidative stress in the corpus mucosa is evoked by long-term treatment of H. pylori-infected patients with proton pump inhibitors. *Hepatology.* 2008;55(81):138-41.
  130. Naumann M. Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295(5):335-41.
  131. Naumann M. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1109-14.
  132. Papa A, Danese S, Sgambato A, Ardito R, Zannoni G, Rinelli A, Vecchio FM, Gentiloni-Silveri N, Cittadini A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Role of *Helicobacter pylori* CagA+ infection in determining oxidative DNA damage in gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37(4):409-13.
  133. Farinati F, Cardin R, Russo VM, Busatto G, Franco M, Rugge M. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter.* 2003;8(3):227-34.
  134. Miehle S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Günther T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdörffer E. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer.* 2000;87(3):322-7.
  135. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arroniz S, Rodríguez C, Cortés JL, Camacho A, Negrete E, Vaca S. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence

- markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009;8:14.
136. Hanigan MH. gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 1998;111-112:333-42.
  137. K. Shibayama, Y. Doi, N. Shibata, T. Yagi, T. Nada, Y. Inuma, Y. Arakawa, Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions, *Infect. Immun.* 2001; 3181–3189.
  138. Kim KM, Lee SG, Park MG, Song JY, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH, Youn HS, Baik SC. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007.
  139. Kim N, Marcus EA, Wen Y, Weeks DL, Scott DR, Jung HC, Song IS, Sachs G. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun.* 2004;72(4):2358-68.
  140. Huang Y, Wang QL, Cheng DD, Xu WT, Lu NH. Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *Helicobacter pylori*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:159.
  141. Bornschein J, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Dig Dis.* 2014;32(3):249-64.
  142. Hatakeyama M. A Sour Relationship between BabA and Lewis b. *Cell Host Microbe.*2017;21(3):318-20.
  143. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem.* 2011;286(28):25256-64.
  144. Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2152-9.
  145. Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 2000;287(5457):1497-500.
  146. Faller G, Keller KM, Claeys D, Buderus S, Kühlwein D, Reiche N, Kirchner T. Prevalence and specificity of antigastric autoantibodies in adolescents infected with *Helicobacter pylori*. *J Pediatr.* 2002;140(1):68-74.
  147. Loke MF, Lui SY, Ng BL, Gong M, Ho B. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50(2):231-8.
  148. Gobert AP, Wilson KT. Human and *Helicobacter pylori* Interactions Determine the Outcome of Gastric Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;400: 27-52. (a)



149. Crabtree JE. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996; 10 Suppl 1:29-37. (a)
150. Tsai HF, Hsu PN. Interplay between *Helicobacter pylori* and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(4):255-9.
151. Crabtree JE. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;215:3-10. (b)
152. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci.* 200;10:853-65.
153. Gobert AP, Wilson KT. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: A blessing in disguise. *Free Radic Biol Med.* 2017;105:16-27.(b)
154. Matysiak-Budnik T, Laszewicz W, Lamarque D, Chaussade S. *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter.* 2006;11 Suppl 1:27-31.
155. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 2000;404(6776):398-402
156. Obst B, Wagner S, Sewing KF, Beil W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2000;21(6):1111-5.
157. Davies GR, Banatvala N, Collins CE, Sheaff MT, Abdi Y, Clements L, Rampton DS. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 1994;29(5):419-24.
158. Erkekoglu P, Oral D, Kocer-Gumusel B, Chao MW. DNA Double-Strand Breaks Caused by Different Microorganisms: A Special Focus on *Helicobacter pylori*. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2017;36(2):131-150.
159. Tominaga K, Kawahara T, Sano T, Toida K, Kuwano Y, Sasaki H, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K. Evidence for cancer-associated expression of NADPH oxidase 1 (Nox1)-based oxidase system in the human stomach. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(12):1627-38.
160. Baik SC. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(2):562-7.
161. Troll W, Wiesner R. The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:509-28.
162. Wei H. Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. *Med Hypotheses.* 1992;39(3):267-70.
163. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-39.

164. Arabski M, Klupinska G, Chojnacki J, Kazmierczak P, Wisniewska-Jarosinska M, Drzewoski J, Blasiak J. DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells. *Mutat Res*. 2005;570(1):129-35.
165. Nishibayashi H, Kanayama S, Kiyohara T, Yamamoto K, Miyazaki Y, Yasunaga Y, Shinomura Y, Takeshita T, Takeuchi T, Morimoto K, Matsuzawa Y. *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*. 2003;18(12):1384-91.
166. Ma N, Adachi Y, Hiraku Y, Horiki N, Horiike S, Imoto I, Pinlaor S, Murata M, Semba R, Kawanishi S. Accumulation of 8-nitroguanine in human gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319(2):506-10.
167. Yabuki N, Sasano H, Tobita M, Imatani A, Hoshi T, Kato K, Ohara S, Asaki S, Toyota T, Nagura H. Analysis of cell damage and proliferation in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa from patients with gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 1997;151(3):821-9.
168. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247-54.
169. Elia MC, DeLuca JG, Bradley MO. Significance and measurement of DNA double strand breaks in mammalian cells. *Pharmacol Ther*. 1991;51(3):291-327.
170. Sentani K, Oue N, Sakamoto N, Nishisaka T, Fukuhara T, Matsuura H, Yasui W. Positive immunohistochemical staining of gammaH2AX is associated with tumor progression in gastric cancers from radiation-exposed patients. *Oncol Rep*. 2008;20(5):1131-6
171. Xie C, Xu LY, Yang Z, Cao XM, Li W, Lu NH. Expression of  $\gamma$ H2AX in various gastric pathologies and its association with *Helicobacter pylori* infection. *OncolLett*. 2014;7(1):159-163.
172. Hartung ML, Gruber DC, Koch KN, Grüter L, Rehrauer H, Tegtmeyer N, Backert S, Müller A. H. *pylori*-Induced DNA Strand Breaks Are Introduced by Nucleotide Excision Repair Endonucleases and Promote NF- $\kappa$ B Target Gene Expression. *Cell Rep*. 2015;13(1):70-79.
173. Koepfel M, Garcia-Alcalde F, Glowinski F, Schlaermann P, Meyer TF. *Helicobacter pylori* Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells. *Cell Rep*. 2015;11(11):1703-13.
174. Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y, Watada M, Yamaguchi N, Yamamoto K, Shiota S, Moriyama M, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. *Infect Immun*. 2014;82(10):4182-9. (b)
175. Kidane D, Murphy DL, Sweasy JB. Accumulation of abasic sites induces genomic instability in normal human gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection. *Oncogenesis*. 2014;3:e128.

176. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17036.
177. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:3-25.
178. Nakamura J, Tanaka T, Kitajima Y, Noshiro H, Miyazaki K. Methylation-mediated gene silencing as biomarkers of gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(34):11991-2006.
179. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arai K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):989-95.
180. Santos JC, Ribeiro ML. Epigenetic regulation of DNA repair machinery in *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(30):9021-37
181. Fehri LF, Rechner C, Janssen S, Mak TN, Holland C, Bartfeld S, Brüggemann H, Meyer TF. *Helicobacter pylori*-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation. *Epigenetics*. 2009;4:577-86.
182. Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol*. 2003;163(4):1551-6.
183. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):194-202.
184. Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H. *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(3):496-500.
185. Chan AO, Lam SK, Wong BC, Kwong YL, Rashid A. Gene methylation in non-neoplastic mucosa of gastric cancer: age or *Helicobacter pylori* related? *Am J Pathol*. 2003;163(1):370-1; author reply 371-3.
186. Huang FY, Chan AO, Rashid A, Wong DK, Cho CH, Yuen MF. *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 $\beta$  activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer*. 2012;118(20):4969-80.
187. Cahill RJ, Xia H, Kilgallen C, Beattie S, Hamilton H, O'Morain C. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci*. 1995;40(8):1627-31.
188. Lynch DA, Axon AT. *Helicobacter pylori*, gastric cancer and gastric epithelial kinetics: a review. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7 Suppl 1:S17-23.
189. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.

190. Machado AM, Figueiredo C, Touati E, Máximo V, Sousa S, Michel V, Carneiro F, Nielsen FC, Seruca R, Rasmussen LJ. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res.* 2009;15(9):2995-3002
191. Machado AM, Desler C, Bøggild S, Strickertsson JA, Friis-Hansen L, Figueiredo C, Seruca R, Rasmussen LJ. *Helicobacter pylori* infection affects mitochondrial function and DNA repair, thus, mediating genetic instability in gastric cells. *Mech Ageing Dev.* 2013;134(10):460-6.
192. Mirzaee V, Molaei M, Shalmani HM, Zali MR. *Helicobacter pylori* infection and expression of DNA mismatch repair proteins. *World J Gastroenterol.* 2008 ;4(43):6717-21.
193. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2516-25.
194. Futagami S, Hiratsuka T, Shindo T, Horie A, Hamamoto T, Suzuki K, Kusunoki M, Miyake K, Gudis K, Crowe SE, Tsukui T, Sakamoto C. Expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 (APE-1) in *H. pylori*-associated gastritis, gastric adenoma, and gastric cancer. *Helicobacter.* 2008; .13(3):209-18
195. Alvarez MC, Ladeira MS, Scaletsky IC, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML. Methylation pattern of THBS1, GATA-4, and HIC1 in pediatric and adult patients infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci.* 2013;58(10):2850-7.
196. Hanada K, Graham DY. *Helicobacter pylori* and the molecular pathogenesis of intestinal-type gastric carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014 ; 14(8):947-54.
197. Bae M, Lim JW, Kim H. Oxidative DNA Damage Response in *Helicobacter pylori*-Infected Mongolian Gerbils. *J Cancer Prev.* 2013;18(3):271-5.
198. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2003;417(1):3-11.
199. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2373-80.
200. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;109(1):33-44.
201. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
202. Hiraku Y. Formation of 8-nitroguanine, a nitrative DNA lesion, in inflammation-related carcinogenesis and its significance. *Environ Health Prev Med.* 2010;15(2):63-72.
203. Ohnishi S, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Hammam O, Murata M, Kawanishi S. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:387014. doi: 10.1155/2013/387014.

- 162Zhang XY, Zhang PY, Aboul-Soud MA. From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori*. *Oncol Lett*. 2017;13(2):543-548.
204. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
205. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
206. Oral D, Koçer-Gümüşel B, Erkeoğlu P. DNA Çift Kırıklarına Neden Olan Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Ajanlar. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2015;35(2):131-145.
207. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247-54.
208. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159-67.
209. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry [Internet]*. 2002;47(4):236-42.
210. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. 2010;594:57-72.
211. Kozmin SG, Sedletska Y, Reynaud-Angelin A, Gasparutto D, Sage E. The formation of double-strand breaks at multiply damaged sites is driven by the kinetics of excision/incision at base damage in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):1767-77.
212. Zhang XY, Zhang PY, Aboul-Soud MA. From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori*. *Oncol Lett*. 2017;13(2):543-548.
213. McCabe ER. Role of mitochondria in oncogenesis. *Biochem Med Metab Biol*. 1992;47(2):105-
214. Vamvakas S, Vock EH, Lutz WK. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol*. 1997;27(2):155-74.
215. Touati E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from *H.pylori*. *Mutat Res*. 2010;703(1):66-70.
216. Drake IM, Mapstone NP, Schorah CJ, White KL, Chalmers DM, Dixon MF, Axon AT. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H pylori* eradication. *Gut*. 1998;42(6):768-71.
217. Davies GR, Crabtree JE. *Helicobacter pylori*: trick or treat? *J R Soc Med*. 1994;87(8):436-9.
218. Davies GR, Banatvala N, Collins CE, Sheaff MT, Abdi Y, Clements L, Rampton DS. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand J Gastroenterol*. 1994;29(5):419-24.

219. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS. Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut*. 1994;35(2):179-85.
220. Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW. Helicobacter pylori increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut*. 1996;38(1):19-22.
221. Kim H. Oxidative stress in Helicobacter pylori-induced gastric cell injury. *Inflammopharmacology*. 2005;13(1-3):63-74.
222. Bagchi D, Bhattacharya G, Stohs SJ. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with Helicobacter pylori. *Free Radic Res*. 1996;24(6):439-50.
223. Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH. Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 1990;58(6):1992-4.
224. Huang XW, Luo RH, Zhao Q, Shen ZZ, Huang LL, An XY, Zhao LJ, Wang J, Huang YZ. Helicobacter pylori induces mitochondrial DNA mutation and reactive oxygen species level in AGS cells. *Int J Med Sci*. 2011;8(1):56-67.
225. Smoot DT, Elliott TB, Verspaget HW, Jones D, Allen CR, Vernon KG, Bremner T, Kidd LC, Kim KS, Groupman JD, Ashktorab H. Influence of Helicobacter pylori on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis*. 2000;21(11):2091-5.
226. Jung HK, Lee KE, Chu SH, Yi SY. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(12):1336-40.
227. Augusto AC, Miguel F, Mendonça S, Pedrazzoli J Jr, Gurgueira SA. Oxidative stress expression status associated to Helicobacter pylori virulence in gastric diseases. *Clin Biochem*. 2007;40(9-10):615-22.
228. Santra A, Chowdhury A, Chaudhuri S, Das Gupta J, Banerjee PK, Mazumder DN. Oxidative stress in gastric mucosa in Helicobacter pylori infection. *Indian J Gastroenterol*. 2000;19(1):21-3.
229. Hagag AA, Amin SM, Emara MH, Abo-Resha SE. Gastric Mucosal Oxidative Stress Markers in Children with Helicobacter Pylori Infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2018;18(1):60-67.
230. Ma Y, Zhang L, Rong S, Qu H, Zhang Y, Chang D, Pan H, Wang W. Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage, and lipid peroxidation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:543760.
231. Tala ZZ, Siregar GA, Siregar GP. Glutathione peroxidase level in patients with Helicobacter Pylori- associated gastritis. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2018; 125.012058.
232. Götz JM, van Kan CI, Verspaget HW, Biemond I, Lamers CB, Veenendaal RA. Gastric mucosal superoxide dismutases in Helicobacter pylori infection. *Gut*. 1996;38(4):502-6.

233. Dulger AC, Aslan M, Nazligul Y, Horoz M, Bolukbas C, Bolukbas FF, Celik H, Kocyigit A. Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative status after eradication therapy in patients infected with *Helicobacter pylori*. *Pol Arch Med Wewn.* 2011;121(12):428-32.
234. Mutlu Önder, Kar Murat, Fadile Yildiz Zeyrek, Aksoy Nurten, Taskin Abdullah. Total antioxidant capacity, total oxidant level and oxidative stress index in patients with laryngopharyngeal reflux with *Helicobacter pylori* IGG positivity *Journal of Medical* 2013; 25-30.
235. Demir S, Yılmaz M, Köseoğlu M, Akalın N, Aslan D. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk J Gastroenterol* 2003;14 (1):39-43.
236. Tevfik Noyan,<sup>1</sup> Hüseyin Guducuoglu,<sup>2</sup> and Mahmut Ilhan A Study of Oxidative Stress Parameters in Anti-*Helicobacter Pylorus* Immunoglobulin G Positive and Negative Gastric Cancer Patients. *Yonsei Med J.* 2009;50(5):677-682.
237. Topal D, Göral V, Yılmaz F. *Helicobacter pylori*'nin İntestinal Metaplazi, Gastrik Atrofi ve Bcl-2 ile İlişkisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Gastroenterohepatology.* 2004;15.
238. Ding SZ, Minohara Y, Fan XJ, Wang J, Reyes VE, Patel J, Dirden-Kramer B, Boldogh I, Ernst PB, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2007;75(8):4030-9.
239. Menaker RJ, Ceponis PJ, Jones NL. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. *Infect Immun.* 2004;72(5):2889-98.
240. Radin JN, González-Rivera C, Ivie SE, McClain MS, Cover TL. *Helicobacter pylori* VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2011;79(7):2535-43.
241. Kim KM, Lee SG, Park MG, Song JY, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH, Youn HS, Baik SC. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(2):562-7.
242. Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(1):16-26.
243. Yao Y, 2000 Yao Y, Zhang D, Luo Y, Zhang D, Huang A, Zhou W, Ren H. Fas ligand expression and apoptosis in primary rat hepatocytes induced by lipopolysaccharide. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2000;8(5):285-7.
244. Ashktorab H, Dashwood RH, Dashwood MM, Zaidi SI, Hewitt SM, Green WR, Lee EL, Daremipouran M, Nouraie M, Malekzadeh R, Smoot DT. *H. pylori*-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria. *Helicobacter.* 2008;13(6):506-17.

245. Ding SZ, Minohara Y, Fan XJ, Wang J, Reyes VE, Patel J, Dirden-Kramer B, Boldogh I, Ernst PB, Crowe SE. Helicobacter pylori infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2007;75(8):4030-9.
246. Zhang XY, Zhang PY, Aboul-Soud MA. From inflammation to gastric cancer: Role of Helicobacter pylori. *Oncol Lett.* 2017;13(2):543-548.
247. Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by Helicobacter pylori. *Gut.* 2002;50(6):771-8.
248. Potthoff A, Ledig S, Martin J, Jandl O, Cornberg M, Obst B, Beil W, Manns MP, Wagner S. Significance of the caspase family in Helicobacter pylori induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter.* 2002;7(6):367-77.
249. Yang Y, Du J, Liu F, Wang X, Li X, Li Y. Role of caspase-3/E-cadherin in helicobacter pylori-induced apoptosis of gastric epithelial cells. *Oncotarget.* 2017;8(35):59204-59216.
250. Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of Helicobacter pylori infection. *Am J Pathol.* 1997;151(6):1695-703.
251. Hasegawa C, Ihara T, Sugamata M. Ultrastructural evaluation of apoptosis induced by Helicobacter pylori infection in human gastric mucosa: novel remarks on lamina propria mucosae. *Med Electron Microsc.* 2000;33(2):82-8.
252. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by Helicobacter pylori. *Gut.* 1996;38(4):498-501.
253. Mizushima N. [Autophagy and apoptosis]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2000;23(6):527-30.
254. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004;306(5698):990-5.
255. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(3):211-6.
256. Raju D, Hussey S, Ang M, Terebiznik MR, Sibony M, Galindo-Mata E, Gupta V, Blanke SR, Delgado A, Romero-Gallo J, Ramjeet MS, Mascarenhas H, Peek RM, Correa P, Streutker C, Hold G, Kunstmann E, Yoshimori T, Silverberg MS, Girardin SE, Philpott DJ, El Omar E, Jones NL. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote Helicobacter pylori infection in humans. *Gastroenterology* 2012;142(5):1160-71.
257. Castaño-Rodríguez N, Kaakoush NO, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. Autophagy in Helicobacter pylori Infection and Related Gastric Cancer. *Helicobacter.* 2015;20(5):353-69.
258. Tsugawa H. [Study of infection strategies of Helicobacter pylori and host cell response against CagA oncoprotein]. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 2014;69(4):565-75.



259. Wang YH, Wu JJ, Lei HY. The autophagic induction in *Helicobacter pylori*-infected macrophage. *Exp Biol Med* (Maywood). 2009;234(2):171-80.
260. Yeniova AÖ, Uzman M, Kefeli A, Basyigit S, Ata N, Dal K, Guresci D, Nazlıgul Y. Serum 8 Hydroxydeoxyguanosine and Cytotoxin Associated Gene Aas Markers for *Helicobacter pylori* Infection *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16.
261. Pignatelli B, Bancel B, Plummer M, Toyokuni S, Patricot LM, Ohshima H. *Helicobacter pylori* eradication attenuates oxidative stress in human gastric mucosa. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(6):1758-66.
262. Katsurahara M, Kobayashi Y, Iwasa M, Ma N, Inoue H, Fujita N, Tanaka K, Horiki N, Gabazza EC, Takei Y. Reactive nitrogen species mediate DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Helicobacter*. 2009;14(6):552-8.
263. Koepfel M, Garcia-Alcalde F, Glowinski F, Schlaermann P, Meyer TF. *Helicobacter pylori* Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells. *Cell Rep*. 2015;11(11):1703-13

## 8. EKLER

### Ek 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

# İNSAN MİDE ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE HELİCOBACTER PYLORİ'NİN NEDEN OLDUĞU DNA ÇİFT SARMAL KIRIKLARI VE OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>14</b>	% <b>12</b>	% <b>2</b>	% <b>6</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% <b>8</b>
<b>2</b>	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>3</b>	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>4</b>	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>5</b>	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>6</b>	belmagumusel.com İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	Submitted to Hacettepe University	

## Ek 2. Dijital Makbuz

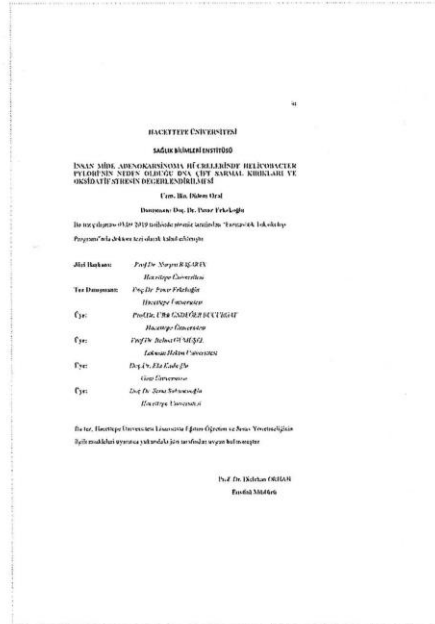


## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Didem Oral  
Ödev başlığı: İNSAN MİDE ADENOKARSİNOMA H.  
Gönderi Başlığı: İNSAN MİDE ADENOKARSİNOMA H.  
Dosya adı: PE TEZ23092019.docx  
Dosya boyutu: 9.07M  
Sayfa sayısı: 230  
Kelime sayısı: 48,628  
Karakter sayısı: 336,570  
Gönderim Tarihi: 24-Eyl-2019 11:54AM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1178960219



## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Didem Oral  
**GSM:** 0530 937 34 69  
**E-mail:** didemoral0669@gmail.com

### Eğitim Bilgileri:

Lisans Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji

Yüksek Lisans Gazi üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı Yüksek Lisans

Doktora Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik  
Toksikoloji Anabilim Dalı

### Yayın ve Posterler :

#### a) *SCI/SCE de taranan yayınlar:*

1. **Oral D**, Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B, Ming-Wei C. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 2016;35(1):48-53.
2. Erkekoglu P, **Oral D**, Kocer-Gumusel B, Chao M-W. DNA Double-Strand Breaks Caused by Different Microorganisms: A Special Focus on Helicobacter pylori. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 2017;36(2):131–150
3. Hepatocellular carcinoma and possible chemical and biological causes: A Review. Erkekoğlu P,**Oral D**, Chao M-W, Kocer-Gumusel B. J.Environ Pathol Toxicol Oncol. 2017;36(2):171-190

**b) Diğer İndexlere giren yayınlar:**

1. Dingil B, **Oral D**, Hatipoğlu MT. Göbekbağı ve İnce Yapısı.(Health Science Research Journal).SBAD5 1994; (12):169-173.
2. **Oral D**, Hatipoğlu T, Özoğul C, Erdoğan D. Sürekli Işık ve Karanlığın Sıçanlarda Parotis Yapısına Etkisi. TCDD Hastaneleri Tıp Bülteni.1996; 8(1-2):10-14.
3. Abalı H, Altundağ M.K, Baltalı E, **Oral D**, Canpınar H, Güç D, Çelik I, Güllü I, Tekuzman G. Does zoledronic acid decrease serum levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. American Society of Clinical Oncology. 2003. Abstract No:862. [www.asco.org/asco/memb](http://www.asco.org/asco/memb).
4. **Oral D**, Koçer-Gümüşel B, Erkeoğlu P. DNA Çift Kırıklarına Neden Olan Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Ajanlar. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. 2015;35(2):131-145.
5. Sur U, **Oral D**, Erkekoğlu P, Gümüşel P. Are Bisphenol Derivatives Safe? Toxic Effects of Bisphenol F and Bishenol S, FABAD J. Pharm. Sci,2017; 42( 3); 225-37.
6. **Oral D**, Sur U, Ozkemahlı G, Yakyon Y, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P. Helicobacter pylori Causes Oxidative Stressand Apoptosis in DNA Double Strand Break Repair Inhibited Human Gastric Adenocarcinoma Cells. Congress.Proceedings,2018.2,1544.doi:10.3390/proceedings2251544. [www.mpdi.com/journal/proceedings](http://www.mpdi.com/journal/proceedings).
7. **Oral D**, Yurun A, Erkekoglu P.Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University Epigenetic and Genetic Changes of Helicobacter Pylori and Their Role in Gastric Carcinogenesis. (Submitted).
8. **Oral D**, Yurun A, Bacanlı M, Başaran N, Akyon Y, Koçer-Gumusel B, Erkekoglu P. Evaluation of DNA damage and DNA repair caused by Helicobacter Pylori in Gastric Adeno Carcinoma Cells.2nd International Euroasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Euroasian Biochem 2019).

**Sözlü Sunumlar:**

1. **Oral D**, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P Effects of Phthalates on Epithelial Mesenchymal Transition. 2<sup>nd</sup> Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences. 4-5 Mayıs 2015. Atina, Yunanistan.

2. **Oral D**, Sur U, Ozkemahlı G, Yakyon Y, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P. Helicobacter pylori Causes Oxidative Stress and Apoptosis in DNA Double Strand Break Repair Inhibited Human Gastric Adenocarcinoma Cells. 2nd International Cell Death Congress. 1-4 November 2018. Izmir, Turkey.
3. **Oral D**, Sur U, Yakyon Y, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P. Autophagic Effects of Helicobacter Pylori Infection in Gastric Adenocarcinoma Cells. 2nd. Zeugma International Congress of Multidisciplinary Studies. 18-20 January 2019. Gaziantep, Turkey.
4. **Oral D**, Sur U, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P. The Role of Genotoxic Effects on Helicobacter Pylori Infection in Gastric Carcinoma Generation. Current Academic Studies in Pharmacy Sciences. International Symposium on Multidisciplinary Studies (ISMS). 27-28 April 2018. Ankara, Turkey.
5. **Oral D**, Yürun A, Bacanlı M, Başaran N, Akyön Y, Koçer-Gümüsel B, Erkekoglu P. Evaluation of DNA damage and DNA repair caused by Helicobacter Pylori in Gastric Adeno Carcinoma Cells. 2<sup>nd</sup> International Euroasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Euroasian Biochem 2019). 28-29 June 2019. Ankara, Turkey.
6. **Oral D**, Sur U, Ozkamahlı G, Yurun A, Zeybek D, Akyon Y, Kocer-Gumusel B, Erkekoğlu P. Helicobacter Pylori Infection Causes Both DNA Single and Double Strand Breaks and Oxidative Stress in Human Adenocarcinoma Cell Line. 10<sup>th</sup> International Congress of the Turkish Society of Toxicology. 16-19 October 2019. Antalya, Turkey (Accepted).

***Poster Sunumları:***

1. Balci A, Yaman U, Erkekoglu P, Ascı A, Yıldıztekin G, **Oral D**, Kocer Gumusel B. Protein Oxidation Levels in Different Organs of Rats Exposed to Aroclor 1254 at Different Selenium Status. International Eurasia Pharmacy Congress. September 3-7 2015. Erzincan, Turkey.
2. **Oral D**, Gümüsel B, Erkekoğlu P. Meme Kanseri Gelişiminde Alkol Tüketiminin Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Alkol Bilimsel Uygulama ve Arastırma Merkezi 'Her Yönü İle Alkol Sempozyumu' 6 Nisan 2017. Ankara, Türkiye.
3. **Oral D**, Gümüsel B, Erkekoğlu P. Alkol ve Tütün Kullanımı ve Pankreas Kanseri İnsidansı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Alkol Bilimsel Uygulama ve Arastırma Merkezi 'Her Yönü İle Alkol Sempozyumu. 6 Nisan 2017. Ankara, Türkiye.
4. Is The Novel Brominated Flame Retardant Tetrabromobisphenol A Safe or Unsafe? **Oral D**, Erkekoglu P, Gumusel B. 2017. İVEK April 26-29 2017. İstanbul, Turkey

5. **Oral D**, Ozkemahlı G, Sur U, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P. Cytotoxic Effects Of Helicobacter Pylori Exposure After Different Multiplicities Of Infection in Human Gastric Adenocarcinoma Cells . 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017) October 2017.Ankara, Turkey.
6. **Oral D**, Ozkemahlı G, Sur U, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P.Oxidative Stress and DNA Damage Caused by Helicobacter Pylori in Human Gastric Adenocarcinoma Cells. IUTOX CTDC 12th SCT. April 18-21 2018.Belgrade, Serbia.
7. Zeybek DN, **Oral D**, Aydın KS, Sur U, Koçer-Gumusel B,Yakyön Y, Erkekoglu P. Changes in the fine structure of the effects of HP on the gastric adenocarcinoma cell line in the presence of DNA double strand breakes repair inhibitor. National Electron Microscopy Congress. April 24-26 2019.Edirne, Turkey.

***Kitap Bölümü:***

**Oral D**, Sur U, Kocer-Gumusel B, Erkekoglu P. The Role of Genotoxic Effects on *Helicobacter Pylori* Infection in Generation on Gastric Carcinoma. International Symposium on Multidisciplinary Studies. ISMS (16-17 Nov, 2018) .Ankara, Turkey. ISBN 978-9940-540-55-5.