

Karotis Arter Aterom Plaklarında *Chlamydia Pneumoniae* ve *Helicobacter Pylori* DNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması

DETECTION OF CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND HELICOBACTER PYLORI DNA IN ATHEROSCLEROTIC PLAQUES OF CAROTID ARTERY BY POLIMERASE CHAIN REACTION

Mehmet Kaplan, *Serap Yılmaz Yavuz, **Vedat Köksal, Bayer Çınar, Mustafa Sinan Kut, Fikri Yapıcı, Hakan Gerçekoğlu, Mahmut Murat Demirtaş

Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, Kalp Damar Cerrahisi Kliniği, İstanbul

*Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı, İstanbul

**Histoloji ve Embriyoloji Uzmanı, İstanbul

Özet

Amaç: Aterosklerozun patogenezi multifaktöriyeldir ve hala tartışılmaktadır. Konvansiyonel risk faktörleri, ateroskleroz patogenezi tam olarak açıklayamamaktadır. Uzun süredir ateroskleroz patogenezi bazen mikroorganizmaların, özellikle *Chlamydia pneumoniae* ve *Helicobacter pylori*'nin olası rolü ileri sürülmektedir, ancak konu hala çözümlenmemiştir. Bu çalışmada, karotis arter aterom plaklarında *C. pneumoniae* ve *H. pylori* DNA'sının varlığı (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile araştırılmıştır.

Materyal ve Metod: Bu prospektif çalışmaya cerrahi girişim için merkezimize başvuran değişik tipte aterosklerotik hastalar olan 104 ardışık hasta dahil edildi. Karotis endarterektomi yapılan hastaların karotis arterlerinden elde edilen 52 aterosklerotik plak örneği çalışmaya grubunu, koroner arter bypass greft operasyonu geçiren hastaların asandan aortaların makroskopik olarak sağlıklı bölgeleri kontrol grubunu oluşturdu. Endarterektomi örneklerinde *C. pneumoniae* ve *H. pylori* DNA'larının varlığı araştırıldı.

Bulgular: *C. pneumoniae* DNA'sı, 52 aterom plağının 16'sında (%30.77), 52 makroskopik olarak sağlıklı asandan aort duvar örneklerinin ise 1'inde (%1.92) saptandı ($p < 0.001$). *H. pylori* DNA'sı ise, 52 aterom plağının 9'unda (%17.31) saptandı. Kontrol grubunda görülmedi ($p = 0.003$). Elli iki plaktan 25'inde (%48) ya *C. pneumoniae* ya da *H. pylori* DNA'sı saptandı.

Sonuç: Sağlıklı vasküler duvar örnekleri ile karşılaştırıldığında, aterosklerotik plaklarda *C. pneumoniae* ve *H. pylori* DNA'sının yüksek insidansı, bu mikroorganizmaların ateroskleroz patogenezi içinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Ateroskleroz, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, polimeraz zincir reaksiyonu

Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2002;10:160-167

Summary

Background: Conventional risk factors cannot completely explain the pathogenesis of atherosclerosis. A possible role of some microorganisms, particularly *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* has been proposed in the pathogenesis of atherosclerosis for a long time, but it is still an unresolved issue. We explored the presence of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in carotid artery atherosclerotic plaques by using "polymerase chain reaction".

Methods: One hundred four consecutive patients with various types of atherosclerotic diseases who admitted to our center for surgical intervention were included in this prospective study. Fifty-two atherosclerotic plaque specimens that were obtained from carotid arteries of the cases who had carotid endarterectomy constituted the study group and 52 specimens obtained from the macroscopically healthy regions of ascending aorta in cases who undergone coronary artery bypass grafting were the control group.

Results: *Chlamydia pneumoniae* DNA was detected in 16 (30.77%) of 52 atherosclerotic plaques and 1 (1.92%) of 52 macroscopically healthy ascending aorta wall specimens ($p < 0.001$). *Helicobacter pylori* DNA was detected in 9 (17.31%) of 52 atherosclerotic plaques and none of the controls ($p = 0.003$). Twenty-five of 52 plaques (48%) were positive either for *Chlamydia pneumoniae* or *Helicobacter pylori*.

Conclusion: Higher incidence of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in atherosclerotic plaques, compared to healthy vascular walls suggests that these microorganisms may play a role in the pathogenesis of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, polymerase chain reaction

Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2002;10:160-167

Sunulduğu Kongre: Türk Kalp Damar Cerrahisi Derneği VII. Ulusal Kongresi, 23-27 Ekim 2002, Antalya

Adres: Dr. Mehmet Kaplan, 67. Ada Kardelen 4-4, D:11 Ataşehir, İstanbul

e-mail: mehmetkaplan@superonline.com

Giriş

Ateroskleroz, multifaktöriyeldir ve kronik inflamatuvar hastalık olarak tanımlanır. Aterosklerotik plak oluşumu, ilerlemesi ve destabilizasyonu için tanımlanan aile öyküsü, hiperlipidemi, hipertansiyon, diabetes mellitus, cinsiyet ve sigara alışkanlığı gibi risk faktörleri ateroskleroz patogenezi tam olarak açıklayamamakta, sadece bazı yönlerine açıklık getirebilmektedir [1].

Son yıllarda elde edilmiş veriler, duodenal ülser, kronik akciğer hastalığı (astma dahil) ve aterosklerotik hastalıklar gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda bir veya birden fazla infeksiyöz ajanın nedensel rolü olabileceğini desteklemektedir [2]. Kronik inflamatuvar hastalıklarda infeksiyöz ajanların nedensel rolü ve birlikteliği, halk sağlığı, tedavi ve korunma açısından oldukça önemlidir. *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) ve *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ateroskleroz patogenezi en çok sorumlu tutulan mikroorganizmalardır [3].

Bu çalışmada, karotis endarterektomi plaklarında ve sağ kalpten asendan aort duvar örneklerinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile *C. pneumoniae* ve *H. pylori* DNA'sı araştırıldı ve seroepidemiolojik bulgular literatür bilgileri ile birlikte tartışıldı.

Materyal ve Metod

Çalışma Hastaları

Haziran 2000 – Aralık 2001 tarihleri arasında, aterosklerotik hastaların cerrahisi için merkezimize başvuran yaklaşık 104 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışma hastanemiz etik komitesi tarafından onaylandı ve çalışma için tüm hastaların rızası alındı.

Karotis endarterektomi yapılan hastaların (n = 52; 36 erkek, 16 kadın; ortalama yaş 67.46 ± 7.84) karotis arterlerinden alınan aterosklerotik plaklardan elde edilen 52 örnek çalışmaya grubunu; koroner arter bypass greft operasyonu yapılan hastaların (n = 52; 38 erkek, 14 kadın; ortalama yaş 62.08 ± 8.62) makroskobik olarak sağ kalpten görünen asendan aort bölgelerinden alınan 52 örnek ise kontrol grubunu oluşturdu. Çalışma grubundaki tüm hastalar semptomatik ve karotis arter stenozu %70'in üzerinde idi. Her iki gruptaki hastaların operasyon öncesi demografik karakteristikleri ve hipertansiyon, diabetes mellitus, lipid profili, sigara alışkanlığı ve miyokard enfarktüsü gibi ateroskleroza ait risk faktörleri ve diğer medikal hikayeleri kayıtlı edildi (Tablo 1).

Cerrahi Teknik

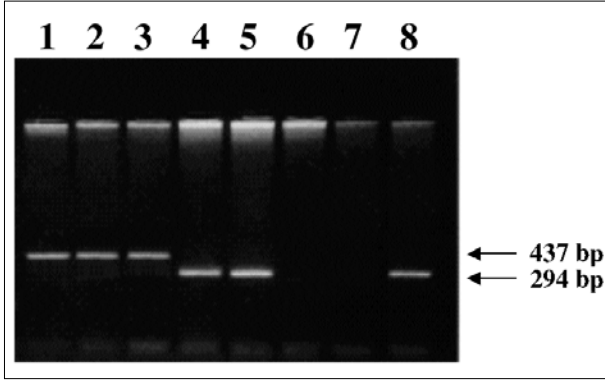
Çalışma grubundaki 40 hastaya yalnızca karotis endarterektomi, 12 hastaya ise hem karotis endarterektomi hem de koroner arter bypass greft operasyonu [9 hastada (%75) kardiyopulmoner bypass ile, 3 hastada (%25) ise atan kalpte] yapıldı. Eş zamanlı uygulanan bu girişimlerde, genel anestezi

Tablo 1. Çalışma ve kontrol gruplarındaki hastaların demografik verileri.

Karakteristikler	Çalışma Grubu (n = 52)	Kontrol Grubu (n = 52)	p değeri*
Ortalama yaş (y)	67.46 ± 7.84	62.08 ± 8.62	
Cinsiyet			0.665
Kadın	16	14	
Erkek	36	38	
Sigara alışkanlığı	22	21	0.842
KOAH	7	3	0.178
Koroner arter hastalığı	25	52;	
		(grup karakteristiği)	< 0.001
Periferik arter hastalığı	5	8	0.372
Hipertansiyon	39	30	0.061
Hiperkolesterolemi	20	18	0.684
Total kolesterol düzeyi (mg/dL)	228 ± 48.12	239 ± 49.19	0.252
Obezite	5	6	0.75
Diabetes mellitus	10	15	0.25
TIA öyküsü	22;	4	< 0.001
	(grup karakteristiği)		
Ansteyli anjina pektoris	2	10	0.011
Risk faktörlerinin kombinasyonu			
Sigara + hipertansiyon	16	9	0.106
Sigara + hiperkolesterolemi	9	2	0.021
Sigara + hipertansiyon + hiperkolesterolemi	3	1	0.618

*p < 0.05 anlamlı

KOAH = kronik obstrüktif akciğer hastalığı; TIA = transiyent iskemik atak



Resim 1. Chlamydia pneumoniae 'Cloned *PstI* geni' ve Helicobacter pylori '*glmM* (Urease C) geni' amplifikasyonu.

(+) kontrol (C. pneumoniae): 1. kolon, C. pneumoniae (+) hastalar: 2. ve 3. kolon, (+) kontrol (H. pylori): 4. kolon, H. pylori (+) hastalar: 5. ve 8. kolon, (-) kontrol: 6. ve 7. kolon

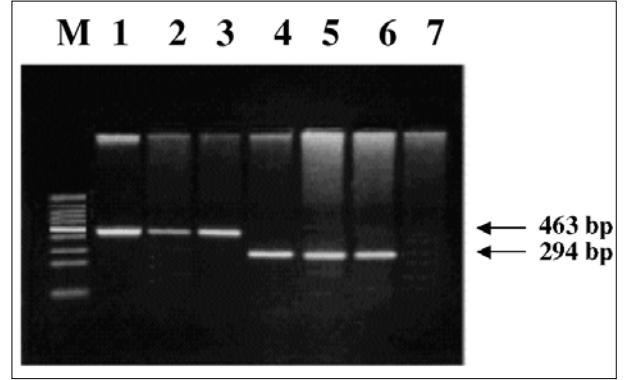
altında karotis endarterektomi yapıldıktan sonra, aorto-sağ atriyal kanülasyon ile kardiyopulmoner bypassa geçilip koroner arter bypass cerrahisi uygulandı. Yalnızca karotis endarterektomisi yapılan olgularda ise lokal anestezi tekniği kullanıldı. Lokal anestezi tekniği olarak, marcain (Bupivacaine Hidrochloride) ile servikal blokaj tercih edildi. Kontrol grubundaki hastalara ise, aorto-sağ atriyal kanülasyonla kardiyopulmoner bypass (n = 45 hasta, %86.53) veya atan kalpte (n = 7 hasta, %13.47) aortokoroner bypass greft operasyonu uygulandı.

Örnek Toplama

Tüm örnekler operasyon odasında steril koşullar altında alındı. Yaklaşık 0.5-1 cm büyüklüğündeki karotis arter ateroskleroz örnekleri, "Tris-EDTA buffer" içeren ependorf mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Ependorf tüpleri operasyon odasında etiketlendi. Mikrobiyolojik incelemeyi yapacak laboratuvar çalışanlar, örneklerin hangi gruptan olduğunu konusunda bilgilendirilmedi.

Örneklerin Transportu ve İncelenmesi

Tüm örnekler 24 saat içinde ve +4°C'de laboratuvara gönderildi. Vasküler doku örneklerinin kalsifiye alanları çıkarıldı, kalan örnekler küçük parçalara (~25 mg) ayrıldı ve DNA ekstraksiyonu için işleme sokuldu. Tüm doku örnekleri, PCR için, "proteinase K (Sigma Chemical) digestion, phenol-



Resim 2. Chlamydia pneumoniae '16S rRNA geni' ve Helicobacter pylori '*glmM* (Urease C) geni' amplifikasyonu.

M: Marker: 100 bp ladder (Promega), (+) kontrol (C. pneumoniae): 1. kolon, C. pneumoniae (+) hastalar: 2. ve 3. kolon, (+) kontrol (H. pylori): 4. kolon, H. pylori (+) hastalar: 5. ve 6. kolon, (-) kontrol: 7. kolon

chloroform extraction ve ethanol precipitation" ile incelendi. Birden fazla çözme-dondurma işleminden kaçınmak için, DNA ekstraktları, küçük miktarlara bölünerek saklandı.

PCR Amplifikasyonu

DNA amplifikasyonları, her bir deoksinekleotid trifosfattan (dNTP) (Fermentas) 200 µM, her bir primerden 2 µM, 2 U *Taq* polymerase (Fermentas), 10 µM Tris-HCL, 50 µM KCl ve 1.5 µM MgCl₂ içeren 50 µl volümde yapıldı. Reaksiyon tüpleri 'PTC-100 thermal cycler (MJ Research)'a yerleştirildi. Globulin primerleri internal pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Miks kontrolü olarak, iki pozitif ve iki negatif kontrol kullanıldı.

PCR yönteminin primer düzenleri, koşulları ve büyüklükleri *C. pneumoniae* için [4,5] Tablo 2'de ve *H. pylori* için [6] ise Tablo 3'te gösterildi. PCR ile *C. pneumoniae*'nin saptanması için 2 farklı PCR analizi 2 farklı primer seti kullanılarak yapıldı (Tablo 2). PCR, her bakteri için farklı günlerde olacak şekilde, her bir primer için en az iki kez yapıldı.

Amplifikasyon ürünleri, 'ethidium bromide' içeren %2 agaroz jelde elektroforez ile *C. pneumoniae* için 437 - 463 bp, *H. pylori* için ise 294 bp düzeyinde gösterildi. Doku hazırlanması, PCR amplifikasyonu ve elektroforez işlemleri, kontaminasyon riskinden kaçınmak için ayrı odalarda gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Tablo 2. Chlamydia pneumoniae PCR analizleri.

PCR hedef geni ve PCR ürünlerinin büyüklükleri	Primer isim ve sekansları	PCR koşulları
1) Cloned <i>PstI</i> , 437 bp	HL1 : 5' gtt gtt cat gaa ggc cta ct 3' HR1 : 5' tgc ata acc tac ggt gtg tt 3'	94 °C - 45 s, 48 °C - 30 s, 72 °C - 30 s (40 devir)
2) 16S rRNA, 463 bp	CpnA : 5' tga caa ctg tag aaa tac agc 3' CpnB : 5' cgc etc tct cct ata aat 3'	94 °C - 1 dk, 45 °C - 30 s, 72 °C - 30 s (40 devir)

bp = base pair; Cpn = Chlamydia pneumoniae; dk = dakika; PCR = polimeraz zincir reaksiyonu; s = saniye

Tablo 3. Helicobacter pylori PCR analizleri.

PCR hedef geni ve PCR ürünlerinin büyüklükleri	Primer isim ve sekanslar	PCR koşulları
GlmM gene, 294 bp	Forward, 5' – aag ctt tta ggg gtg tta ggg gtt–3' Reverse, 5' – aag ctt act ttc taa cac taa cgc– 3'	93 °C - 1 dk, 55 °C - 1 dk, 72 °C - 1 dk (35 devir)

bp = base pair; dk = dakika; PCR = polimeraz zincir reaksiyonu

Tablo 4. Çalışma grubunda Chlamydia pneumoniae ve Helicobacter pylori saptanan hastaların demografik verileri.

Karakteristikler	Çalışma Grubu (n = 52)		ODDS Ratio (%95 CI: Alt sınır < OR < Üst sınır)	
	CP (+)	HP (+)	CP	HP
Ortalama yaş (y)	66.44 ± 10.07	65.89 ± 8.04		
Cinsiyet				
Kadın	3	3	0.09 < 0.297 < 1.70	0.25 < 0.90 < 5.33
Erkek	13	6		
Sosyoekonomik düzey			p = 0.790*	p = 0.205*
Kötü	7	2		
Orta	6	4		
İyi	3	3		
Aterom plakları			p = 0.630*	p = 0.603*
Organize	8	7		
Yumuşak	3	1		
Tromboze	2	0		
Ülsere	2	1		
Sigara alışkanlığı	7	1	0.33 < 0.66 < 3.58	0.01 < 0.14 < 1.14
KOAH	3	2	0.36 < 1.53 < 9.42	0.35 < 2.02 < 13.5
Koroner arter hastalığı	15	1	4.5 < 42.8 < 335.3	0.01 < 0.11 < 0.86
Periferik arter hastalığı	4	1	1.18 < 13.6 < 114.9	0.12 < 1.44 < 12.4
Hipertansiyon	14	5	0.56 < 2.58 < 15.9	0.07 < 0.25 < 1.49
Hiperkolesterolemi	4	3	0.11 < 0.28 < 1.54	0.17 < 0.59 < 3.48
Obezite	1	1	0.05 < 0.62 < 5.19	0.12 < 1.44 < 12.4
Diyabetes mellitus	6	1	1.13 < 3.55 < 20.5	0.05 < 0.53 < 4.28
TIA öyküsü	8	4	0.48 < 0.95 < 5.15	0.26 < 0.82 < 4.72
Anstabil anjina pektoris	2	1	0.14 < 3.37 < 39.8	0.29 < 7.69 < 92.8

*p < 0.05 anlamlı, Pearson Chi-Square testi;

CP = Chlamydia pneumoniae; HP = Helicobacter pylori; KOAH = kronik obstrüktif akciğer hastalığı; OR = odds ratio; TIA = transiyent iskemik atak

istatistiksel analiz, SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ve MATLAB 6.0.88 Release 12 (MATrix LABORatory, The MathWorks, Inc, Boston, MA, USA) programları kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. 0.05'in altındaki p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışma ve kontrol gruplarının demografik verilerinin istatistiksel karşılaştırılmasında cinsiyet, sigara içme alışkanlığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, obezite, diyabetes mellitus, transiyent iskemik atak öyküsü ve anstabil anjina pektoris için “başlıbaşına” grup oranlarının karşılaştırılması” esasına dayanan

“Likelihood Ratio testi” ve “Fisher’s Exact testi”, kolesterol düzeyleri için ise “başlıbaşına” 2 grup ortalamasının karşılaştırılması” esasına dayanan “Independent-Samples T testi” ve kolesterol düzeylerinin varyanslarının homojenitesini kontrol etmek amacıyla da “Levene’s f testi” kullanıldı. Çalışma grubunda C. pneumoniae ve H. pylori saptanan olguların sahip oldukları kişisel ve çevresel özelliklerinin mevcut olma olasılığı “Pearson Chi-Square testi” ve “Odds Ratio (OR) testi” ile araştırıldı. Hesaplanan OR değerlerinin anlamlılığı, %95 “Confidence Interval (CI; güven aralığı)” sınırları hesaplanarak test edildi ve “1” değerini içermeyen aralıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (p < 0.05). Mikrobiyolojik inceleme sonucu saptanan C. pneumoniae ve H.

Tablo 5. Çalışma grubu olguların demografik özelliklerinin *Chlamydia pneumoniae* ve *Helicobacter pylori* pozitifliğine etkilerinin analizi.

Karakteristikler	Çalışma Grubu (n = 52)		p değeri* ODDS Ratio (%95 CI: Alt sınırlar < OR < Üst sınırlar)	
	CP (n = 16)	HP (n = 9)	CP	HP
Cinsiyet				
Kadın	3	3		
Erkek	3	6	<i>p</i> = 0.162	<i>p</i> = 0.851
			0.78 < 1.84 < 4.33	0.42 < 1.10 < 2.90
Sigara	7	1	<i>p</i> = 0.766	<i>p</i> = 0.053
			0.55 < 1.11 < 2.28	0.98 < 3.16 < 10.16
Hipertansiyon	14	5	<i>p</i> = 0.156	<i>p</i> = 0.199
			0.24 < 0.52 < 1.28	0.73 < 1.81 < 4.47
Hiperkolesterolemi	4	3	<i>p</i> = 0.290	<i>p</i> = 0.867
			0.71 < 1.49 < 3.10	0.45 < 1.08 < 2.56
Diyabetes mellitus	6	1	<i>p</i> = 0.056	<i>p</i> = 0.355
			0.21 < 0.46 < 1.01	0.54 < 1.73 < 5.57

**p* < 0.05 anlamlı.

CP = *Chlamydia pneumoniae*; HP = *Helicobacter pylori*; OR = odds ratio

pylori için risk etkenlerinin önemini belirlemek amacıyla *C. pneumoniae* ve *H. pylori* pozitifliği "Dikotom" nominal "başlı başına" deyimleri olarak kabul edildiler. Cinsiyet, sigara, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve diyabetes mellitus ise "kategorik bağımsız deyimler" olarak regresyon analizine dahil edildi ve uygulanacak regresyon modelinin "Binary Lojistik Regresyon Analizi" olmasına karar verildi.

Bulgular

Çalışma ve kontrol gruplarındaki hastaların demografik verileri Tablo 1'de gösterildi. İki grup arasında yaş, cinsiyet ve bilinen risk faktörleri (sigara alışkanlığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, periferik arter hastalığı, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, obezite ve diyabetes mellitus) açısından fark saptanmadı. Preoperatif transiyent iskemik atak oranı (*p* < 0.001, Likelihood Ratio testi) çalışma grubunda, koroner arter hastalığı (*p* < 0.001, Likelihood Ratio testi) ve anstabil anjina pektoris (*p* = 0.011, Likelihood Ratio testi) ise kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek idi.

Çalışma grubunda *C. pneumoniae* pozitifliği %30.77 (16 hasta) iken, *H. pylori* pozitifliği %17.31 (9 hasta) idi. Kontrol grubunda ise, *C. pneumoniae* %1.9 (1 hasta), *H. pylori* ise %0 oranında saptandı. Üç ay arayla sağ ve sol karotis endarterektomi yapılan bir hastanın, her iki karotis endarterektomi materyalinde de *H. pylori* pozitif saptandı. Bu hastaya ait risk faktörleri hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve sigara idi.

C. pneumoniae pozitifliği açısından çalışma ve kontrol gruplarında elde edilen sonuçlar (sırasıyla %30.77 ve %1.9) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi [*p* < 0.001 (2-yönlü), Pearson Chi-Square testi]. *H. pylori* pozitifliği

yönünden çalışma ve kontrol grupları arasındaki farka (sırasıyla %17.31 and %0) bakıldığında ise, sonuç yine istatistiksel olarak anlamlı bulundu [*p* = 0.003 (2-yönlü), Fisher's Exact testi].

Mikrobiyolojik incelemelerinde *C. pneumoniae* ve *H. pylori* saptanan olguların sahip oldukları demografik özellikler incelendi ve bu özellikleri çalışma olasılıkları hesaplanarak Tablo 4'te gösterildi. Aterom plaklarında *C. pneumoniae* pozitif olan çalışma grubu hastalarının ortak özellikleri de Tablo 4'te özetlendi. Bu grupta *C. pneumoniae* saptanan olgularda koroner arter hastalığı bulunma olasılığı 42.8 kat, periferik arter hastalığı bulunma olasılığı 13.6 kat, obezite bulunma olasılığı ise 3.55 kat fazla bulundu ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlı idi (*p* < 0.05). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı 1.53 kat, hipertansiyon 2.58 kat, anstabil anjina pektoris 3.37 kat fazla olasılıkla görülmesine rağmen bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (*p* > 0.05). Diğer özellikler ise istatistiksel olarak anlamsız olasılıklarla düşük saptandı (*p* > 0.05).

H. pylori pozitif olan hastaların ortak özellikleri de Tablo 4'te gösterildi. *H. pylori* saptanan olgularda koroner arter hastalığı bulunma olasılığı anlamlı olarak artmamıştı (OR = 0.11, *p* < 0.05). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı 2.02 kat, periferik arter hastalığı 1.44 kat, obezite 1.44 kat ve anstabil anjina pektoris 7.69 kat yüksek olasılıkla bulunmasına rağmen bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (*p* > 0.05). Diğer özellikler ise istatistiksel olarak anlamsız olasılıklarla düşük saptandı (*p* > 0.05). Olguların, varsayılan risk etkenlerinin *C. pneumoniae* ve *H. pylori* pozitifliğine etkilerinin analizinde 'nominal bağımsız deyimler' *C. pneumoniae* ve *H. pylori*, 'kategorik bağımsız deyimler' ise cinsiyet, sigara, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve

diabetes mellitus olarak belirlendi; %95 CI değerleri ve risk etkenlerinin geręekleřime olasılıkları *C. pneumoniae* ve *H. pylori* için ayrı ayrı hesaplandı. Yapılan analizlerde hiğbir risk etkeninin bu olasılıkları istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırmadığı saptandı (Tablo 5).

Tartışma

Ateroskleroz patogenezinde diabetes mellitus, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara kullanımı ve aile öyküsü gibi birçok risk faktörü tanımlanmış olmakla birlikte, bu faktörler patogenezi tam olarak açıklayamamaktadır ve aterosklerozu ne şekilde neden olduklarına dair geręek mekanizmalar henüz tanımlanmamıştır [1,4].

Son yıllarda aterosklerozda kronik bir inflamatuvar sürecin söz konusu olduğu güçlü kanıtlarla gösterilmiştir [7]. Ateroskleroz için bilinen klasik risk faktörleri ile kronik inflamasyon göstergeleri arasında bağlantı kurulamaz, bunların dışında faktörlerin söz konusu olabileceğini düşündürmüştü ve duodenal ülserde olduğu gibi, kronik enfeksiyonun bu inflamasyona yol açabileceğini akla getirmiştir. Günümüzde ateroskleroz patogenezinde rolü olabileceği konusunda en çok incelenen mikroorganizmalar *C. pneumoniae*, *H. pylori*, sitomegalovirus ve periodontal infeksiyonlara yol açan bazı bakterilerdir [3]. Çalışmamızda, bu ajanlardan şu ana kadar en güçlü kanıtların yer aldığı *C. pneumoniae* ve ülkemizde yaygın olarak enfeksiyona yol açan *H. pylori*'nin aterosklerotik plaklardaki varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı. Sıklıkla solunum yolları infeksiyonlarına yol açan *C. pneumoniae*'nin aterosklerozda rol alan makrofajlar ve endotel hücreleri gibi hücrelere tropizm göstermesi nedeniyle ateroskleroz patogenezinde rolü olabileceği düşünülmektedir [8]. *C. pneumoniae* ve ateroskleroz arasında ilişki olabileceği ilk kez 1988 yılında Saikku ve arkadaşları [9] tarafından yapılan seroepidemiyolojik bir çalışmaya ile gösterildi. Bu çalışmadan sonra yapılan 25'den fazla seroepidemiyolojik çalışmanın büyük çoğunluğunda *C. pneumoniae* pozitifliği ile ateroskleroz arasında pozitif bir bağlantı bulundu [3]. Seroepidemiyolojik çalışmalardan sonra aterosklerozda *C. pneumoniae*'nin varlığını gösteren patolojik ve mikrobiyolojik çalışmalar yapıldı [10,11].

İlk kez Shor ve arkadaşları [10], koroner arter aterosklerozunda PCR yöntemi ve elektron mikroskopisi ile *C. pneumoniae* varlığını gösterdi. Bu çalışmadan sonra PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda çoğunluğunda aterosklerozda *C. pneumoniae* pozitifliği belirlenmekle birlikte, oranlar oldukça farklılık gösterdi [3]. Bazı çalışmalar, incelenen örneklerin tümünde *C. pneumoniae* pozitifliği olduğunu [11], bazıları ise hiç saptayamadıklarını [12] bildirdi. Bunun en önemli nedeni, PCR yöntemlerinin standartize olmamasıdır. Apfalter ve arkadaşları [13] tarafından yapılan bir çalışmada, 15 endarterektomi örneğinde 9 ayrı merkezde ayrı ayrı PCR yöntemi ile *C. pneumoniae* arandığı ve bu çalışma sonucunda laboratuvarlar arası *C. pneumoniae* pozitiflik oranının %0-60 arasında geręekleştiği bildirilmektedir. PCR ile yapılan deneylerde bu şekilde değerlendirilen sonuçlar alınmasının nedenleri *C. pneumoniae*'nin aterosklerotik lezyonlardaki dağılımının parçalı olması, incelenen aterosklerotik dokunun yetersizliği, laboratuvar yöntemlerinin standart olmaması, ateroskleroz

plaklarından *C. pneumoniae* DNA ekstraksiyonunun yapılamaması ve aterosklerozda PCR inhibitörlerinin yer alması olarak ileri sürülmektedir [14].

C. pneumoniae PCR testlerinin standardizasyonunu sağlamak ve PCR ile *C. pneumoniae* belirlenmesini engelleyebilecek faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla, "Center for Disease Control (CDC) of USA" ve "CDC of Canada" tarafından, "*C. pneumoniae* deneylerinin standardizasyonu" adı altında bir rehber hazırlandı [15]. Çalışmamızda *C. pneumoniae* için örnek alma, transport, ekstraksiyon ve PCR işlemlerinde bu öneriler doğrultusunda hareket edildi ve bu rehberde standart metod olarak önerilen dört yöntemden ikisi [4,5] kullanıldı. Bu iki yöntem ile de *C. pneumoniae* pozitiflik oranı %30.77 olarak belirlendi. Ülkemizden kısa süre önce, yine 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan bir çalışmada da aterosklerozda *C. pneumoniae* oranı %26 olarak bildirildi [16]. Çalışmamızda kullanılan diğer primerle Washington Üniversitesi'nden yapılan bir çalışmada, karotis arter aterosklerozunda PCR ile *C. pneumoniae* pozitiflik oranı %24 olarak bildirilmiştir [17]. Arteriyel örneklerden alınan aterosklerozda *C. pneumoniae* varlığını araştıran 30 çalışmanın genel olarak değerlendirildiği bir çalışmada, *C. pneumoniae*'nin PCR yöntemi ile pozitiflik oranı ortalama %25, normal vasküler dokularda ise %1 veya daha az oranda belirlendi [14]. Çalışmamızda karotis arter aterosklerozunda PCR ile belirlenen %30.77'lik pozitiflik oranı bu sonucu desteklemektedir.

Çalışmamızda, *C. pneumoniae* pozitif hastalarda koroner arter hastalığının ve periferik arter hastalığının var olmasıyla 42.8 ve 13.6 kat yüksek bulundu ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlı idi. Bu bulgular, *C. pneumoniae*'nin aterosklerozdaki rolünün, sadece belli arterleri etkileyen lokal bir mekanizma ile değil, tüm arterlerin (koroner, periferik, karotis gibi) aterosklerozu ile sonuçlanan sistemik bir mekanizma ile olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde de koroner arter, aort, karotis arteri, baziller arter ve renal arter aterosklerotik plaklarında PCR yöntemi ile *C. pneumoniae* gösterilmiştir [16,18,19]. Serojik olarak *C. pneumoniae* ile ateroskleroz arasındaki bağlantının belirlenmesi olması ve mikrobiyolojik ve patolojik olarak *C. pneumoniae*'nin aterosklerozda yer alması, *C. pneumoniae* enfeksiyonu ile ateroskleroz arasında kesin bir neden-sonuç ilişkisi olduğunu göstermemekte ve mikroorganizmanın aterosklerozda "masum bulunma" olması ekarte edememektedir. *C. pneumoniae* ile ateroskleroz arasında nedensel bir ilişkiyi gösterebilmek için hayvan deneyleri ve aterosklerotik hastalığı bulunan insanlarda antiklamidyal antibiyotiklerle tedavi çalışmaları yapıldı. Hayvan deneylerinde, *C. pneumoniae* enfeksiyonunun aterosklerotik lezyonların gelişmesine yol açtığı ve antiklamidyal tedavinin bu lezyonların gelişimini büyük oranda engellediği gösterildi [20].

Aterosklerotik hastalığı bulunan insanlarda antiklamidyal antibiyotiklerle yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirildi. İlk kez Gupta ve arkadaşları [21] tarafından 1997 yılında, miyokard infarktüsü geçirmiş 220 hastada azitromisin tedavisi uygulanmasının kardiyak olay riskini azalttığı gösterildi. Ancak bu küçük çalışmadan sonra yapılan ve sonuçları kısa süre önce açıklanan 7,700 hastalık "weekly intervention with

zithromax (Azitromisin) for atherosclerosis and its related disorders (WIZARD)” çalışmasında [22,23], 3 aylık Azitromisin tedavisinin kardiyak olay riskinde plasebo ile karşılaştırıldı. ı bu çalışmada %7’lik azalma gösterildi, fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirildi. 2003 yılında tamamlanması beklenen ve daha uzun süreli (1 yıl) Azitromisin uygulanan “Azithromycin coronary events study (ACES)” alışması [24] sonuçları bu konuyu daha büyük oranda aydınlatmayı düşünmektedir. Ancak klinik çalışmaların sonuçları olumlu ya da olumsuz olması, *C. pneumoniae*’nin aterosklerozdaki rolü konusuna kesin bir yanıt veremeyecektir. Çünkü mikroorganizma verilen tedavi ile eradike edilemeyebilir veya *C. pneumoniae* aterosklerozun başlangıç aşamasında söz konusu olabilir ki, bu da sekonder deñil primer korumayı gündeme getirmekte ve araştırmasını doğurmaktadır [3].

Ateroskleroz patogenezinde rol alabileceği düşünölen diğer bir mikroorganizma da *H. pylori*’dir. *H. pylori* gram negatif, spiral bir basil olup, duodenal ülserde nedensel bir rolü olduğu gösterilmiştir [2]. *H. pylori* ile ateroskleroz arasındaki bağlantıya dair, *C. pneumoniae*’da olduğu gibi güçlü kanıtlar henüz yoktur. Ancak, ülkemiz gibi *H. pylori* infeksiyon sıklığının %80’lerin üzerinde olduğu ülkelerde [25], bu konunun aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. *H. pylori* ile ateroskleroz arasında ilişki olduğu na dair yapılan çalışmaların çoğunluğu serolojiktir. Bu tür bir ilişki ilk kez 1994 yılında Mendall ve arkadaşları [26] tarafından bildirildi. Daha sonra yapılan yaklaşık 20 kadar serolojik çalışmanın bir kısmı bu çalışmayı desteklemiş olmakla birlikte [3], 1998 yılında Danesh ve arkadaşları [27] tarafından yapılan 18 çalışmanın meta-analizinde, *H. pylori* seropozitivitesi ile belli vasküler risk faktörleri arasında bir ilişki belirlenemediği ve daha önce bildirilen bu ilişkilerin rastlantısal olduğu ileri sürüldü. Ancak *H. pylori* infeksiyon sıklığının özellikle ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde çok yüksek olması, serolojik çalışmaların deñerini azaltmaktadır. Çünkü yapılacak herhangi bir çalışmada kontrol grubunda da *H. pylori* seropozitivitesi %80’in üzerinde olacak ve hasta grubu ile karşılaştırılması anlamsız olmayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda, aterosklerozda PCR yöntemi ile direkt *H. pylori* varlığını araştırıldı. Aterosklerozda direkt *H. pylori* arayan literatürde bizim çalışmamızda toplam 8 çalışmaya ulaşılabildi [16,18,19,28-32]. Bu çalışmaların 4’ünde aterosklerozda *H. pylori* varlığı belirlenemezken [18,28-30], diğer dört çalışmada ise *H. pylori* varlığı gösterildi [16,19,31,32]. Aterosklerozda PCR yöntemi ile *H. pylori* belirlenemesinde *C. pneumoniae*’da olduğu gibi PCR ile ilgili standardizasyon problemlerinin rolü olabilir.

Çalışmamızda *H. pylori* belirlemek için kullanılan glmM (üreaz C) primeri, *H. pylori*’nin belirlenmesinde, günümüzdeki en spesifik primer olarak kabul edilmektedir [33]. Aterosklerozda PCR yöntemi ile *H. pylori* belirlenmesi olan çalışmalarda, pozitiflik oranı %22-51 arasında deñilmektedir [16,30-32]. Bizim alışmamızda da aterosklerozda *H. pylori* pozitiflik oranı %17.31 olarak saptanırken, sağ ve sol karotis damar dokularında %0 olarak belirlendi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.003$). Ayrıca 3 ay ara ve sol karotis endarterektomi operasyonu uygulanan bir hastanın sağ ve sol karotisinden alınan çalışmalarında aterosklerozda

ikişinde de *H. pylori* pozitif bulunması, *H. pylori*’nin aterosklerozda lokal deñil, sistemik bir etki oluşturması göstermektedir.

Sosyoekonomik seviyenin *H. pylori* infeksiyonları ile ilişkili olduğu bilinmektedir [34]. *H. pylori* pozitifliği saptanan bizimle birlikte toplam 5 çalışmanın 2’sinin ülkemizden [16], birinin de yine gelişmekte olan bir ülke olan Arjantin’den [31] bildirilmesi olması, *H. pylori* infeksiyon sıklığının %80’lerin üzerinde olduğu ülkelerde, bu mikroorganizmanın aterosklerozda rolü olabileceğini akla getirmektedir.

C. pneumoniae’da olduğu gibi, aterosklerozda *H. pylori*’nin de belirlenmesi, aterosklerozla *H. pylori* arasında bir nedensellik olduğunu kesin olarak göstermemektedir. Böyle bir nedensellik ilişkisini araştırmak için kısa süre önce yapılan bir hayvan deneyinde, *H. pylori*’nin farelerde ateroskleroz yaratmadığı gösterildi [35]. Eldeki veriler, *H. pylori*’nin aterosklerozdaki rolünü belirlemek için oldukça yetersizdir ve ileri deneysel ve klinik araştırmalara gereksinim vardır.

Dikkati çeken diğer bir konu, gerek *C. pneumoniae*’nin, gerekse *H. pylori*’nin eldeki verilere göre aterosklerozda olmazsa olmaz bir faktör olmadığıdır. Çünkü bizim olgularımızda da olduğu gibi, yaklaşık %50 olguda bu mikroorganizmalar herhangi birine rastlanmadı. Bu durumda, söz konusu mikroorganizmaların ateroskleroz patogenezinde zorunluluk deñil, kolaylaştırıcı faktör olması yüksektir.

Sonuç olarak, çalışmamızda karotis arter ateroskleroz plaklarında, sağ ve sol karotis damar duvarına göre anlamlı derecede yüksek oranda *C. pneumoniae* ve *H. pylori* (*C. pneumoniae* için $p < 0.001$; *H. pylori* için ise $p = 0.003$) saptanması, ateroskleroz patogenezinde hem *C. pneumoniae*’nin, hem de *H. pylori*’nin rolü olabileceğini düşüncesini desteklemektedir.

Kaynaklar

1. Wilson PW, D’Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
2. Cassel GH. Infectious causes of chronic inflammatory disease and cancer. *Emerg Infect Dis* 1998;4:475-87.
3. Muhlestein JB. Chronic infection and coronary artery disease. *Med Clin North Am* 2000;84:123-48.
4. Campbell LA, Perez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:434-9.
5. Gaydos CA, Quinn TC, Eiden JJ. Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1992;30:796-800.
6. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of Helicobacter pylori in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 1993;39:338-44.
7. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997;349:462-6.
8. Saikku PA. Chlamydia. In: Armstrong D, Cohen J, eds. *Infectious Disease*. London: Mosby, 1999:1-7.

9. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;2:983-6.
10. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J* 1992;82:158-61.
11. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1997;25:499-505.
12. Paterson DL, Hall J, Rasmussen SJ, Timms P. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of Australian patients. *Pathology* 1998;30:169-72.
13. Apfalter P, Blasi F, Boman J, et al. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of Chlamydia pneumoniae in endarterectomy specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:519-24.
14. Kuo C, Campbell LA. Detection of Chlamydia pneumoniae in arterial tissues. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 3):432-6.
15. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: Recommendations from the centers for disease control and prevention (USA) and the laboratory centre for disease control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001;33:492-503.
16. Farsak B, Yıldırım A, Akyön Y, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:4408-11.
17. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodriguez DI, Lee A, Grayston JT. Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis* 1997;176:292-5.
18. Blasi F, Denti F, Erba M, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae but not Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol* 1996;34:2766-9.
19. Rassa M, Cazzavillan S, Scagnelli M, et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis* 2001;158:73-9.
20. Fong IW. Antibiotics effects in rabbit model of Chlamydia pneumoniae-induced atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 3):514-8.
21. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azitromisin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:404-7.
22. Dunne MW. Rationale and design of a secondary prevention trial of antibiotic use in patients after myocardial infarction: The WIZARD (weekly intervention with zithromax [Azitromisin] for atherosclerosis and its related disorders) trial. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 3):572-8.
23. O'Connor C, Dunne MW. Weekly intervention with zithromax (Azitromisin) for atherosclerosis and its related disorders' (WIZARD) trial. First large-scale study of antibiotic potential in reducing cardiovascular events. March 18 2002: www.pfizer.com/pfizerinc/about/press/zithromaxrelease0318.html.
24. Grayston JT. Secondary prevention antibiotic treatment trials for coronary artery disease. *Circulation* 2000;102:1742-3.
25. Özden A, Dumlu S, Özkan H ve ark. Transmission of Helicobacter pylori. *Gastroenteroloji* 1994;5:441-5.
26. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, et al. Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 1994;71:437-9.
27. Danesh J, Peto R. Risk factors for coronary heart disease and infection with Helicobacter pylori: Meta-analysis of 18 studies. *Br Med J* 1998;316:1130-2.
28. Malnick SD, Golland S, Kaftoury A, et al. Evaluation of carotid arterial plaques after endarterectomy for Helicobacter pylori infection. *Am J Cardiol* 1999;83:1586-7.
29. Danesh J, Koreth J, Youngman L, et al. Is Helicobacter pylori a factor in coronary atherosclerosis? *J Clin Microbiol* 1999;37:1651.
30. Radke PW, Merkelbach-Bruse S, Messmer BJ, et al. Infectious agents in coronary lesions obtained by endarterectomy: Pattern of distribution, coinfection, and clinical findings. *Coron Artery Dis* 2001;12:1-6.
31. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE. Detection of Helicobacter pylori in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 2001;32:385-91.
32. Kowalski M. Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: Influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. *J Physiol Pharmacol* 2001;52(Suppl 1):3-31.
33. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, et al. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37:772-4.
34. Megraud F, van Loon FPL, Thijsen SFT. Curved and spiral bacilli. In: Armstrong D, Cohen J, eds. *Infectious Disease*. London: Mosby, 1999;1-14.
35. Mach F, Sukhova GK, Michetti M, Libby P, Michetti P. Influence of Helicobacter pylori infection during atherogenesis in vivo in mice. *Circ Res* 2002;90:E1-4.