

HEPATİT C VİRUS ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDA VİRAL YÜK İLE MALONDİALDEHİD VE ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN İLİŞKİSİ*

THE RELATIONSHIP BETWEEN VIRAL LOAD AND MALONDIALDEHYDE AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS INFECTION

Selçuk KAYA, Recep SÜTÇÜ**, Emel SESLİ ÇETİN**, Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN**, Onur AKTÜRK***, Namık DELİBAŞ*****

ÖZET: Oksidatif stresin hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunun patogenezinde katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, HCV ile enfekte hastalarda virus yükü ile antioksidan enzimler ve malondialdehid (MDA) seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Serolojik ve moleküler yöntemlerle HCV belirleyicileri pozitif olarak saptanan 50 hasta ile kontrol olarak 40 sağlıklı gönüllü çalışmaya alınmıştır. Hastalar viral yüklerine göre alt gruplara ayrılmış ve gruplarda eritrosit katalaz (Aebi metodu ile), süperoksit dismutaz (SOD; Woolliams ve arkadaşlarının metodu ile) ve glutatyon peroksidaz (GP; Paglia ve Valentine'nin metodu ile) aktiviteleri ile serum MDA düzeyleri (Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu ile) ölçülmüştür. HCV ile enfekte hasta grubunda SOD ve GP düzeylerinde azalma tespit edilirken, katalaz ve MDA düzeylerinde kontrol grubuna oranla artış tespit edilmiş, bu değişiklikler, katalaz hariç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, $t = 19.3$). Bununla birlikte, viral yüklerine göre alt gruplar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$, $t = 1.6$). Sonuç olarak, bizim bulgularımız HCV ile enfekte hastalarda antioksidan enzim aktivitelerinde düşüklük ile oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyelerinde bir artış olduğunu göstermekle birlikte bu değişikliklerin hastalardaki viral yük ile ilişkilendirilemeyeceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Hepatit C virus (HCV), malondialdehid (MDA), antioksidan enzimler.

ABSTRACT: Oxidative stress is known to participate in the pathogenesis of HCV infection. The aim of this study was to investigate the relationship between antioxidant defence state, malondialdehyde (MDA) and viral load in patients with hepatitis C virus (HCV) infection. Fifty patients who were positive for serological

* 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji (25-28 Nisan 2006, Ankara) Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

*** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta.

and molecular markers of HCV infection, and 40 healthy volunteers as control group were included in the study. The patients were classified according to their viral loads, and the catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GP) activities of erythrocytes and MDA in sera of all groups were measured. These substances were detected by using the methods described by Aebi, Woolliams et al, Paglia and Valentine, Draper and Hadley, respectively. As a result, decrease in SOD and GP levels and increase in MDA and catalase levels have been detected in HCV infected patients when compared with healthy controls, and these differences were statistically significant ($p < 0.05$, $t = 19.3$), except for catalase. However, there were no statistically significant difference among groups classified according to viral load ($p > 0.05$, $t = 1.6$). Although our data in HCV infected patients demonstrate a significant decrease in antioxidant enzyme levels and a significant increase in MDA levels, a marker of oxidative stress, it could not possible to make a correlation between these differences and the viral loads of patients.

Key words: Hepatitis C virus (HCV), malondialdehyde (MDA), antioxidant enzymes.

G İ R İ Ş

Hepatit C virusu (HCV) tüm dünyada endemik olarak görülen ve yaklaşık olarak nüfusun %3'ünü etkilediği tahmin edilen kan kaynaklı bir patojendir¹. HCV oldukça yavaş ilerleyen kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biridir. Birçok çalışmada, HCV ile ilişkili karaciğer hasarının, lipid ve protein oksidasyon ürünlerinin artmış hepatik ve serum düzeyleri ile karakterize olduğu bildirilmiştir².

Hücreler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GP) gibi antioksidan enzimlerle ve doğal antioksidan ürünler sayesinde oksidatif hareketlere karşı korunmaktadır. Hücreye zarar verebilen reaktif oksijen türlerinden olan süperoksit radikali, oksijenin bir elektronla indirgenmesi sonucu oluşur. Endojen radikal kaynağı olan aktive fagositlerde fagositozdan sonra, NADPH oksidaz sistemi çevre dokulardaki moleküler oksijeni süperokside dönüştürür. Bu durumda polimorfonükleer lökositte oksijen tüketimi 80 kat artar ve bu oksijen özellikle kısa ömürlü (O_2 , H_2O_2) ve uzun ömürlü hipokloröz asit olmak üzere toksik oksijen ürünlerin üretiminde kullanılır. Daha sonra süperoksit, SOD ile hidrojen perokside dönüştürülür. Fazla miktarda peroksid katalaz veya GP ile nötralize edilir³⁻⁵.

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) oluşumuna yol açar. MDA, yağ asidi oksidasyonunun özgül ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonu (LPO)'nun derecesiyle korelasyon gösterir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur⁶.

Kronik HCV enfeksiyonlarında karaciğer hasarının mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. İndirek bulgular, oksidatif stres ve mitokondrial hasarın rol oynayabileceğini düşündürmektedir⁷. Ayrıca kronik HCV enfeksiyonlu hastaların klinik

olarak değerlendirilmesinde MDA ölçümünün ek bilgi vereceği ileri sürülmüştür⁸. Bu çalışmada, HCV ile enfekte hastalarda virus yükü ile antioksidan enzimler ve LPO ürünü olan MDA düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu: Çalışmaya; HCV enfeksiyonuna yönelik tedavi almamış, anti-HCV (AxSYM, Abbott Laboratories, USA) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; ticari kit kullanılarak, GeneAmp 7700 sequence detector system, Perkin Elmer) ile HCV RNA'sı pozitif 50 hasta ile kontrol grubu olarak sağlıklı ve gönüllü 40 kişi alındı. Gerçek zamanlı PCR, 6×10^3 - 6×10^9 doğrusallık alanında ticari kit (Roboscreen, Leipzig, Germany) kullanılarak çalışıldı. Çalışma grubu ayrıca HCV RNA kopya sayısına göre dört alt gruba ayrıldı; grup 1: viral yükü 10^3 kopya/ml'den az olan 12 hasta; grup 2: viral yükü $1-9.9 \times 10^3$ kopya/ml olan 6 hasta; grup 3: viral yükü $1-9.9 \times 10^4$ kopya/ml olan 8 hasta; grup 4: viral yükü 10^5 ve üzeri kopya/ml olan 24 hasta'dan oluşturuldu.

SOD Aktivitesi Ölçümü: Woolliams ve arkadaşlarının⁹ metoduna göre uygulandı. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen O_2^- radikallerinin 2-(4-iodophenyl)-3-4-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.

GP Aktivite Ölçümü: Paglia ve Valentine'nin¹⁰ metoduna göre uygulandı. GP, oksidasyon kofaktörü (cumen hydroperoxide) tarafından glutatyon oksidasyonunu katalizler. Okside glutatyon, NADPH varlığında glutatyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, $NADP^{+}$ 'ye oksitlenir. NADPH'nin azalmasına bağlı olarak 340 nm de meydana gelen absorpsiyon değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanır.

Katalaz Aktivite Ölçümü: Aebi¹¹ metoduna göre uygulandı. Katalaz aktivitesi, hidrojen peroksidin katalaz tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile belirlenir.

MDA Tayini: LPO ürünlerinden olan MDA, Draper ve Hadley'in⁶ tiobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü. Metodun prensibi MDA-TBA (tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm'de verdikleri absorpsiyonun ölçülmesi esasına dayanır.

İstatistiksel Değerlendirme: Windows SPSS 10.0 programında Mann Whitney U, t test yöntemleri kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarında saptanan eritrosit SOD, GP, katalaz ve serum MDA düzeyleri Tablo I'de verilmiştir. Hasta grubunda katalaz ve MDA düzeylerinde kontrol grubuna oranla artış olup, MDA düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $t = 19.3$) iken, katalaz düzeylerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, $t = 1.6$). Ayrıca, SOD ve GP düzeylerinde kontrol grubuna göre saptanan düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, $t = 8.8$ ve $t = 14.1$).

Tablo I: Kontrol ve HCV Enfeksiyonlu Hasta (altgruplar dahil) Gruplarında SOD, GP, Katalaz ve Serum MDA Düzeyleri

Gruplar	SOD (U/g Hb)	GP (U/g Hb)	Katalaz (kU/gHb)	MDA (nmol/ml)
	(ortalama±standart deviasyon)			
Kontrol (n: 40)	1334.54 (273.9)	77,12 (24.23)	21.31 (7.22)	0.20 (0.05)
Hasta (n: 50)	807.89 (286.02)	18.17 (11.57)	25.07 (14.03)	1.35 (0.41)
Altgrup1 (n: 12)	859.84 (403.03)	24.03 (21.97)	22.87 (9.90)	1.33 (0.21)
Altgrup2 (n: 6)	800.60 (240.34)	16.23 (1.61)	19.76 (7.36)	1.16 (0.17)
Altgrup3 (n: 8)	749.05 (327.68)	14.87 (6.53)	19.65 (12.57)	1.24 (0.41)
Altgrup4 (n: 24)	803.34 (220.71)	16.83 (4.04)	29.30 (16.56)	1.45 (0.51)

Hasta alt grupları arasında eritrosit SOD, GP, katalaz ve serum MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Viral yükün 10^5 kopya/ml ve üzeri olduğu dördüncü grupta MDA düzeyinin daha yüksek olmasına karşın, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

TARTIŞMA

Hepatik hasar ve fibrozisle sonuçlanan çeşitli karaciğer hastalıklarının patogeneğinde serbest radikaller ve lipid peroksitleri giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Hücre membranlarının önemli bir bileşeni olan polianstüre yağ asitleri, serbest oksijen radikallerine bağlı olarak lipoperoksidasyona (LPO) uğrar. LPO'nun ise hepatosit zedelenmesinin ana nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir¹². LPO'nun aldehitik ürünlerinden olan MDA'nın kollajen gen ekspresyonunu ve üretimini artırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan bu aldehitik ürünlerin profibrogenetik sitokinleri salan Kupffer hücrelerini de aktive ettiği bilinmektedir¹². İzole perfüze karaciğer ve izole hepatositler üzerinde yapılan araştırmalar, serbest oksijen radikallerinin hücresel fonksiyon ve bütünlükte bozulmaya neden olduğunu göstermiştir^{12,13}.

Kronik HCV enfeksiyonlarında karaciğer hasarının mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. İndirek bulgular, oksidatif stres ve mitokondriyal hasarın rol oynayabileceğini düşündürmektedir¹⁴. Oksidatif hasar, mitokondride HCV kor proteininin direk etkisi sonucu ortaya çıkabilir. HCV kor proteini karaciğerde inflamasyon olmadığında bile oksidan/antioksidan durumunu değiştirerek, HCV enfeksiyonunun hepatoselüler karsinoma geliştirmesine veya en azından kolaylaştırmasına katkıda bulunabilir¹⁴. Reaktif oksijen ürünleri, kronik HCV enfeksiyonunun ilerleyişinde ve hasarın ortaya çıkışında rol oynarlar. Hepatoselüler hasarlanmada en önemli delil, hücresel glutatyon konsantrasyonunda özellikle de, mitokondriyal "slow-turnover"-glutatyon havuzunda azalmadır. Glutatyon, efektif immün sisteme katkı sağlaması bakımından, konak antioksidatif kapasitesinin temel yapıtaşlarından biridir¹⁵.

Tam olarak doğrulanmamasına rağmen, kronik hepatit C'de endojen antioksidan glutatyonun azalmış hepatik ve sistemik düzeyleri, serum ALT, viral yük ve hepatik inflamasyonun derecesi ile uyumlu bulunmuştur. Kronik viral enfeksiyonun, alkol toksisitesi veya metal yüklenmesine bağlı pro-oksidatif ortamın,

hepatik fibrosklozu hızlandırması sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Bu bulguların ışığında, kronik hepatit C'de lipit ve protein oksidasyonunun ortaya çıktığı ve oksidatif hasarın hastalık aktivasyon derecesi ile ilişkili olan artan serum MDA seviyeleri ile gösterilebileceği söylenebilir^{1,16}. Bu çalışmada da, HCV enfeksiyonu olan hasta grubunda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, oksidatif stresin büyüklüğünden dolayı artmış serbest radikallerin üretimini yansıtan serum MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Ancak serum MDA seviyeleri ile viral yük, dördüncü hasta alt grubunda (HCV RNA: $>10^5$ kopya/ml) en yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Romero ve arkadaşlarının⁸ kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda yaptıkları bir çalışmada, karaciğerin histopatolojik bulgusunun derecesinin ALT aktivesinden çok MDA konsantrasyonları ile uyumlu olduğu gösterilmiş, bu hastaların klinik değerlendirmesinde MDA ölçümünün ek bilgi vereceği ileri sürülmüştür. İnterferon (IFN) tedavisi sırasında serum ALT düzeyleri hızla normale dönerken, serum MDA düzeylerinin IFN tedavi sırası veya sonrasında tedavi öncesine göre anlamlı bir şekilde düşme gösterdiği, ancak kontrol grubu değerlerine ulaşmadığı bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda hastaların hiçbirinin tedavi almamış olmasına dikkat edilerek sadece viral yük üzerinden değerlendirme yapılması amaçlanmış ve viral yük ile MDA arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Hemodiyalizli ve HCV viremili hastaların, çeşitli hastalıklarda oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılabilen serum tioredoksin (TRX) düzeylerinde, HCV viremisiz hemodiyaliz hastalarına oranla büyük bir artış olduğu gösterilmiş ve diyalizli hastalarda HCV enfeksiyonunun en azından oksidatif stresi ağırlaştırdığı ifade edilmiştir¹⁷.

Chrobat ve arkadaşları¹⁸, kronik hepatit B ve C'li çocuklarda GP aktivitesindeki artış ile katalaz ve SOD düzeylerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca kronik viral hepatitli çocuklarda antioksidan bariyer eksikliğinin mümkün olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹⁸. Bizim çalışmamızda da, HCV enfeksiyonu olan hastalarda GP ve SOD düzeylerinde azalma ve katalaz düzeylerinde artma tespit edilmiştir.

Kronik HCV enfeksiyonu, sıklıkla siroza yol açar ve hepatoselüler kanserin önemli bir risk faktörüdür. Kronik hepatit C'de, azalan hepatik ve sistemik antioksidan glutatyon serum ALT aktivitesi, viral yük ve hepatik inflamasyonun şiddeti ile uyumlu bulunmuştur². Bu sonuçlar antioksidan tedavinin en azından deneysel çalışmalarda kullanılması için adımlar atılmasını sağlamış ve HCV patogezine ışık tutmuştur. Mitokondri fonksiyonlarını engelleyebilecek (mitokondrial DNA'nın depleasyonu dahil) serbest radikal üretimindeki artış; IFN tedavisine direnç nedeni olan etkenlerden birisi olabilir, böylece HCV'nun temizlenmesinde immünolojik mekanizmaların zayıflatılmasına yol açabilir¹⁹. Alfa-IFN'a cevap vermeyen konik C hepatitli 120 hastada yapılan randomize bir çalışmada, tedaviye vitamin E ve N-asetil sistein'in eklenmesinin, tedavi etkinliğine katkısı olmamıştır²⁰. Bununla birlikte IFN'a dirençli olgularda, IFN ile birlikte N-asetil sistein gibi bir antioksidanın kullanılması, viremiyi temizleyememesine rağmen serum transaminazlarda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur²¹.

Oksidatif stresin HCV enfeksiyonunun patogenezeine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bizim bulgularımız da, viral yük ile antioksidan savunma sistemi ve LPO ürünü olan MDA arasında bir ilişki bulunmamasına rağmen, HCV enfeksiyonlu hastalarda antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ile oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeylerinde anlamlı bir artışın olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 291-5.
2. Okuda M, Li K, Beard MR, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterol* 2002; 122: 568-71.
3. Bast A, Goris RJA. Oxidative stres. *Biochemistry and human disease. Pharm Weekbl Sci* 1989; 11:199-206.
4. Halliwell B. Free radicals, antioksidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-4.
5. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidants balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-7.
6. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-31.
7. Li K, Prow T, Lemon SM, Beard MR. Cellular response to conditional expression of hepatitis C virus core protein in Huh7 cultured human hepatoma cells. *Hepatology* 2002; 35: 1237-46.
8. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, et al. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 993-7.
9. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983; 34: 253-6.
10. Paglie DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
11. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105: 121-6.
12. Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 343-8.
13. Kaçmaz B, Öğüş E, Paşaoğlu H, Kılıç D, Tülek N, Bakır F. Akut ve kronik viral hepatitli hastalarda lipid peroksidasyonu ve oksidasyona direncin incelenmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 2001; 7: 374-8.
14. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, et al. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4365-70.
15. Look MP, Gerard A, Rao GS, et al. Interferon/antioxidant combination therapy for chronic hepatitis C- a controlled pilot trial. *Antiviral Res* 1999; 43: 113-22.
16. Zhang W, Cox AG, Taylor EW. Hepatitis C virus encodes a selenium-dependent glutathione peroxidase gene. Implications for oxidative stress as a risk factor in progression to hepatocellular carcinoma. *Med Klin (Munich)* 1999; 94: 2-6.
17. Kato A, Odamaki M, Nakamura H, Yodoi J, Hishida A. Elevation of blood thioredoxin in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection. *Kidney Int* 2003; 63: 2262-8.

18. Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit* 2000; 6: 713-8.
19. Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, et al. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatology* 1999; 30: 774-82.
20. Ideo G, Bellobuono A, Tempini S, et al. Antioxidant drugs combined with alpha-interferon in chronic hepatitis C not responsive to alpha-interferon alone: a randomized, multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 1203-7.
21. Larrea E, Belouqui O, Muñoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1235-41.