

# KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA SERUM NİTRİK OKSİT DÜZEYİ İLE HBV-DNA VE ALT DÜZEYLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

## INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN SERUM NITRIC OXIDE LEVELS, HBV-DNA AND ALT LEVELS IN CHRONIC HEPATITIS B PATIENTS

Aslı Gamze ŞENER<sup>1</sup>, Sevin KIRDAR<sup>2</sup>, Mukadder SERTER<sup>3</sup>, İlhan AFŞAR<sup>1</sup>, Ece Mine DEMİR<sup>3</sup>, Cengiz CEYLAN<sup>4</sup>, Neriman AYDIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir. (agsener@gmail.com)

<sup>2</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

<sup>3</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın.

<sup>4</sup> Atatürk Devlet Hastanesi, Hematoloji Bölümü, Aydın.

### ÖZET

Kronik inflamatuvar olaylar sırasında karaciğer hücreleri tarafından sentezlenen nitrik oksit (NO)'in aşırı üretiminin kronik hepatit B patogeneğinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Bu çalışmada kronik hepatit B (KHB) hastalarında serum NOx (nitrit + nitrat) düzeyleri ile viral yük ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. 2006-2007 yılları arasında gerçekleştirilen çalışmaya 93 KHB hastası (67 erkek, 26 kadın; ortalama yaş: 47.3 ± 10.9 yıl) ile 53 sağlıklı kontrol birey (17 erkek, 36 kadın; ortalama yaş: 58.6 ± 2.1 yıl) dahil edilmiştir. Hepatit B virusu (HBV) serolojik göstergeleri kemilüminesans yöntemi (Ortho-Clinical Diagnostics, ABD) ile; HBV-DNA düzeyi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (ABI PRISM 7700, Applied Biosystem, CA) ile; ALT düzeyleri ise Aeroset System (Abbott Laboratories, ABD) ile çalışılmıştır. NOx düzeyinin saptanmasında, nitratın kadmiyumla nitrite indirgenmesi yöntemi kullanılmıştır. Hastaların ALT düzeylerinin ortalaması 98.7 ± 138.4 IU/l; viral yük ortalaması ise 1.6 × 10<sup>9</sup> ± 4.0 × 10<sup>9</sup> kopya/ml olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının ortalama NO düzeyleri karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla; 30.6 ± 21.7 µmol/l ve 23.7 ± 5.2 µmol/l; p < 0.05). Olgularda çalışılan parametreler arasındaki ilişki araştırıldığında; viral yük ile ALT değerleri arasında pozitif korelasyon saptanırken (r = 0.768; p < 0.001); NO ile viral yük ve NO ile ALT değerleri arasında anlamlı korelasyon belirlenmiştir (sırasıyla; r = 0.346, p = 0.001 ve r = 0.314, p = 0.002). Sonuç olarak çalışmamızda, KHB hastalarında serum NO düzeylerinin kontrollere göre daha yüksek bulunmuş olmasına ve NO ile ALT ve HBV-DNA düzeyleri arasında anlamlı bir ilişkinin saptanmasına karşın, NO'nun hastalık patogeneindeki rolünün aydınlatılması için serum düzeylerinin yeterli olmayacağı ve hücresel düzeyde ileri araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit B virusu, kronik hepatit B, nitrik oksit, HBV-DNA, ALT.

## ABSTRACT

It has been reported that increased nitric oxide (NO) production by the hepatocytes during chronic inflammatory processes, plays an important role in the pathogenesis of chronic hepatitis B. The aim of this study was to investigate the relationship between serum levels of NOx (nitrite + nitrate) with the viral load and alanine aminotransferase (ALT) levels in chronic hepatitis B (CHB) patients. A total of 93 CHB patients (67 male, 26 female; mean age:  $47.3 \pm 10.9$  years) and 53 healthy control subjects (17 male, 36 female; mean age:  $58.6 \pm 2.1$  years) followed-up during 2006-2007 period were included to the study. Hepatitis B virus (HBV) serologic markers, viral load and ALT levels were studied by chemiluminescence method (Ortho-Clinical Diagnostics, USA), by real-time polymerase chain reaction (PCR) (ABI PRISM 7700, Applied Biosystem, CA), and by Aeroset System (Abbott Laboratories, USA), respectively. NOx levels were determined by a method which was based on the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. Mean levels of ALT and HBV-DNA of the patients were found as  $98.7 \pm 138.4$  IU/l and  $1.6 \times 10^9 \pm 4.0 \times 10^9$  copies/ml, respectively. In the evaluation of mean levels of NOx in patient and control groups, the difference was found statistically significant ( $30.6 \pm 21.7$   $\mu$ mol/l and  $23.7 \pm 5.2$   $\mu$ mol/l, respectively;  $p < 0.05$ ). In view of the relationship between the parameters, a positive correlation was detected between viral load and ALT levels ( $r = 0.768$ ;  $p < 0.001$ ), besides the significant correlations between NOx and viral load, and NOx and ALT ( $r = 0.346$ ,  $p = 0.001$  and  $r = 0.314$ ,  $p = 0.002$ , respectively). As a result, although the NOx levels in chronic hepatitis patients were found higher than those in the control group, and significant correlations were detected between NO, viral load and ALT, the exact role of NO in the disease pathogenesis and outcome needs to be studied further at cellular level.

**Key words:** Hepatitis B virus, chronic hepatitis B, nitric oxide, HBV-DNA, ALT.

## GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV) enfeksiyonu dünyada ve ülkemizde en önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünyada yaklaşık 400 milyon kişinin bu virusu taşıdığı tahmin edilmektedir<sup>1</sup>.

Nitrik oksit (NO), kronik yangısal olaylarda karaciğerin parankima ve parankima dışı hücreleri tarafından nitrik oksit sentetaz (NOS) aracılığıyla L-arjininden sentezlenen önemli bir moleküldür<sup>2,3</sup>. Farklı biyolojik aktiviteleri olan lipofilik bir gaz olan NO hem bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde hem de doku hasarı ve kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır<sup>2,4</sup>. NO'nun kronik viral hepatitli hastalarda indüklenebilir NOS aracılığıyla inflamasyonlu karaciğer dokusundan sentezlendiği bildirilmektedir<sup>4</sup>. Hem akut hem de kronik hepatit enfeksiyonlarında NO'nun antimikrobiyal etkileri gösterilmekle birlikte, kronik karaciğer inflamasyonunda NO'nun fazla miktarda oluşumunun genotoksik etkilerle karaciğer kanserine yol açabileceği bildirilmektedir<sup>5,6</sup>.

İndüklenebilir NOS, karaciğer hücreleri, endotelial hücreler ve Kupffer hücrelerinde eksprese edilmektedir. Bu enzim aracılığı ile sentezlenen NO yangısal yanıtta önemli bir moleküldür. Deneysel çalışmalar, HBV'nin enfekte hepatositlerde NO üretimini indüklediğini göstermiştir<sup>7</sup>. Kronik viral hepatitte NO'nun aşırı üretiminin önemli patojenik olaylara aracılık ettiği bildirilmektedir<sup>3,4</sup>. NO'nun mikroorganizma, parazit ve tümör hücrelerine karşı görev yaparak doku hasarına karşı karaciğeri koruyucu görev yaptığı kabul edilmektedir<sup>8</sup>. Bununla birlikte aşırı ve uzun süreli NO üretimi karaciğer hasarı ile de sonuçlanabilir<sup>3</sup>. Hayvan deneyi çalışmaları ile NO'nun HBV replikasyonunu inhibe ettiği ve gama-interferonun antiviral aktivitesine aracılık ettiği gösterilmiştir<sup>7,9</sup>.

Bu çalışmada kronik hepatit B (KHB) hastalarında serum NO düzeyleri ile viral yük arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2006-2007 yılları arasında HBV viral yük ölçümü için kan örnekleri gönderilen 93 KHB hastası ile 53 sağlıklı kontrol alındı. KHB hastalarının tanısı, artmış serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ile HBsAg ( $\geq 6$  ay) ve serum HBV-DNA pozitifliği ile konuldu.

Kan örnekleri venden alındıktan sonra, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. ALT düzeyleri, Aeroset System (Abbott Laboratories, ABD) enzimatik yöntemle belirlendi. HBV serolojik göstergeleri kemilüminesan yöntem (VITROS, Ortho-Clinical Diagnostics, ABD) ile çalışıldı. Örneklerden HBV-DNA izolasyonu, Robogene Quantification Kit (Roboscreen, Almanya) ile üretici firmanın önerilerine göre yapıldı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile (ABI PRISM 7700, Applied Biosystem, CA) çalışıldı. Çalışmanın dinamik aralığı (HBV-DNA Viral Quality Control-VQC panele göre)  $10^3$ - $10^8$  kopya/ml idi.

NOx (nitrit + nitrat) düzeyinin belirlenmesi için Navarro-Gonzalves ve arkadaşlarının<sup>10</sup> kadmiyum-indirgeme yönteminin modifikasyonu kullanıldı. Bu yöntem; nitratın kadmiyum granülleri kullanılarak nitrite indirgenmesi ile örneklerdeki toplam nitrit düzeyinin saptanması prensibine dayalıdır. Serum örneği (400 µl), %30'luk 80 µl ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu eklendikten sonra oda ısısında 10.000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek deproteinize edildi. Kadmiyum granülleri (2-2.5 g) deiyonize distile su ile 3 kez yıkandı ve 5 dakika süresince glisin-NaOH tampon çözeltisi (15 g/l, pH 9.7) içindeki CuSO<sub>4</sub> (5 mmol/l) solüsyonunda santrifüj edildi (bakır kaplı granüller 10 dakika içinde kullanılır ve sonrasında granüller yıkanarak 0.1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solüsyonunda saklanır ve böylece yenilenebilir). Kalibratörler, 20 mmol/l NaNO<sub>2</sub> stok solüsyonu deiyonize distile su ile sulandırılarak hazırlandı. Aktive edilmiş kadmiyum granülleri (2-2.5 g) kalibratör ve serum örneklerine (1 ml) eklendi. Örnekler 10 dakika boyunca karıştırılarak sonrasında nitrit saptanması için tüplere aktarıldı. Nitrit üretimi, sülfanilamidin diazotizasyonu ve naftilendiamine bağlanması ile saptandı. Örneklerin absorbansları mikropleyt okuyucuda 540 nm'de okutuldu. Nitrit konsantrasyonu otomatik olarak sodyum nitritin 2.0-80 µmol konsantrasyonlarının standart eğrisi esas alınarak belirlendi. Veriler µmol/l nitrit + nitrat olarak rapor edildi.

## İstatistiksel Analiz

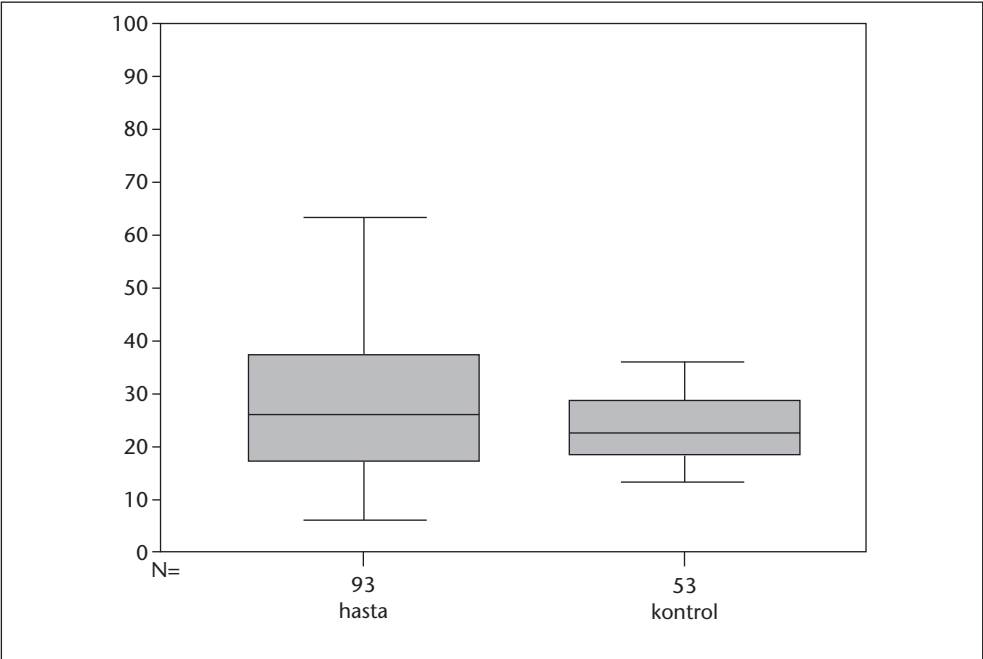
Hasta ve kontroller arası istatistiklerde parametrik olmayan Student's t testi, ROC analizi, hasta grup için parametrik olmayan Spearman korelasyon analizi kullanıldı ve p<0.05 anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. SPSS 10.0 programı kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 93 KHB hastası (67 erkek, 26 kadın; ortalama yaş:  $47.3 \pm 10.9$  yıl) ile 53 kontrol bireyin (17 erkek, 36 kadın; ortalama yaş:  $58.6 \pm 2.1$  yıl) cinsiyet dağılımları

ve yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Hastaların ALT düzeylerinin ortalaması  $98.7 \pm 138.4$  IU/l; viral yük ortalaması ise  $1.6 \times 10^9 \pm 4.0 \times 10^9$  kopya/ml olarak saptanmıştır. NO düzeyi ortalamaları değerlendirildiğinde; KHB hastalarında  $30.6 \pm 21.7$   $\mu\text{mol/l}$ , kontrol grubunda ise  $23.7 \pm 5.2$   $\mu\text{mol/l}$  olarak tespit edilen NO düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 1). KHB'li 93 hastanın cinsiyete göre alt grup analizi yapıldığında; yaş, NO ve ALT değerleri arasında bir fark saptanmazken viral yükte istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir (Tablo I).

Olgularda çalışılan parametreler arasındaki ilişki araştırıldığında; viral yük ile ALT düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanırken; NOx ile viral yük ve ALT düzeyleri arasında anlamlı korelasyon belirlenmiştir (Tablo II). Hasta ve kontrol grupları arasında NOx için



Şekil 1. Hasta ve kontrollerin NOx düzeyleri.

Tablo I. Kronik Hepatitli Hastaların Cinsiyete Göre Çalışılan Parametreler Açısından Karşılaştırılması

	Erkek (n= 67)	Kadın (n= 26)	p
Yaş (yıl)	46.9 ± 11.2	48.2 ± 10.1	> 0.05
NOx (µmol/l)	31.0 ± 17.3	29.7 ± 30.7	> 0.05
ALT (IU/l)	113.2 ± 158.8	61.3 ± 44.0	> 0.05
HBV-DNA (kopya/ml)	2.1E + 08	2.9E + 07	<b>0.004</b>

**Tablo II. Olgularda Çalışılan Parametreler Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve p Değerleri**

Parametreler	r değeri	p değeri
HBV-DNA ve ALT düzeyi	0.768	< 0.001
NOx ve HBV-DNA düzeyi	0.346	0.001
NOx ve ALT düzeyi	0.314	0.002

ROC analizinde "cut-off" değeri 30.6  $\mu\text{mol/l}$  olarak tespit edilmiş (duyarlılığı 36.6, özgüllüğü 92.5, pozitif prediktif değeri 89.5, negatif prediktif değeri 45.4); AUC (Area Under ROC Curve) ise  $0.575 \pm 0.04$  ( $p= 0.12$ ) olarak bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Bir antimikrobiyal ajan gibi davranarak mikroorganizmaları öldüren ya da replikasyonlarını azaltan NO, aynı zamanda bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır<sup>8</sup>. Yapılan çalışmalarda, HBV ile enfekte hastalarda serum NO düzeyini düşük saptayan araştırmacıların<sup>11</sup> yanı sıra, kontrollere göre daha yüksek düzeylerin saptandığını bildiren yayınlar da vardır<sup>12,13</sup>. Çalışmamızda da, KHB hasta grubunda NO düzeyleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (sırasıyla;  $30.6 \pm 21.7 \mu\text{mol/l}$  ve  $23.7 \pm 5.2 \mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0.05$ ).

Kronik viral hepatitli hastaların hepatositlerinde iNOS sunumunda belirgin bir artış olduğu gözlemlendiğinden, bu hücrelerin NO yönünden önemli bir kaynak olduğu bildirilmektedir<sup>4,14,15</sup>. NO düzeylerindeki farklılıkların karaciğer hasarının düzeyi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. HBV enfeksiyonunun seyirindeki karaciğer hasarında, konağın çeşitli viral antijenlere karşı oluşturduğu özgül ve özgül olmayan bağışık yanıt rol oynamaktadır<sup>16</sup>. Son zamanlarda HBV ile enfekte edilmiş hayvan modellerinde, karaciğerde NO'nun HBV replikasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır<sup>8,9</sup>. Parvu ve arkadaşları<sup>12</sup> kronik karaciğer hastalığı (kronik aktif hepatit ve siroz) olan 92 hastayı kapsayan çalışmalarında, tüm hastaların serum nitrit/nitrat düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olduğunu, ancak kronik aktif hepatitli hastaların nitrit/nitrat düzeylerindeki yükselmenin istatistiksel anlamı olmadığını bildirmektedirler. Kandemir ve arkadaşları<sup>17</sup> ise viral hepatitli 63 ve farklı nedenlerle transaminaz yüksekliği bulunan 13 hastanın biyopsi örneklerini inceledikleri çalışmada, viral hepatitli grupta hepatik indüklenbilir NOS artışından ve hastalığın histolojik şiddeti ile pozitif ilişkisi bulunduğundan söz etmektedirler. Benzer sonuçların saptandığı başka bir çalışmada<sup>13</sup> kronik karaciğer hastalığının, NO sentezinde artışa yol açan intrahepatik indüklenbilir NOS ekspresyonu ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Bu çalışmada da, bizim sonuçlarımız ile benzer şekilde KHB'li olguların NO düzeyi kontrol grubundan anlamlı oranda yüksektir<sup>13</sup>. Yine Ersoy ve arkadaşları<sup>18</sup> da sonuçlarımıza benzer olarak KHB hastalarında serum NO düzeyinde belirgin bir yükselme olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlardan farklı olarak, Amaro ve arkadaşları<sup>19</sup>, kronik HBV ve hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonu olan hastaların serum NO düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu bildirmektedirler. Diğer bir çalışma-

da, KHB hastalarında NO düzeyindeki yükselmenin az ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığı istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirtilmektedir<sup>7</sup>. Çalışmamızda hasta grubunda kadın ve erkek cinsi arasında NO ve ALT düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmazken, viral yüklerinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Viral yük ile cinsiyet arasında ilişkiyi gösteren çalışmalara literatürde rastlanmamış, bu durumun rastlantısal olabileceği ya da erkek hasta sayısının daha fazla olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada viral yük ve ALT değerleri arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Serumda belirlenen NO değerleri ise ALT ve viral yük ile yine anlamlı korelasyon göstermektedir. Okamoto ve arkadaşları<sup>20</sup> transgenik farelerle yaptıkları çalışmada, bu çalışmaya benzer şekilde serum ALT ve NO düzeylerinde artış saptamışlardır. Shao ve arkadaşlarının<sup>21</sup> KHB'li 213 hastayı kapsayan çalışmalarında, HBeAg pozitif grupta HBV-DNA ile ALT ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri arasında korelasyon saptanmadığı, HBeAg negatif grupta ise HBV-DNA ile AST arasında korelasyon saptanmazken HBV-DNA ve ALT arasında korelasyon bulunduğu bildirilmektedir.

NO, stabil bir molekül olmayıp derhal nitrit ve nitrat ürünlerine parçalanmaktadır. Nitrit ve nitrat düzeyi, NO'nun düzeyinin saptanmasında dolaylı bir gösterge olarak kullanılmaktadır<sup>10</sup>. NOx düzeyinin saptanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biri nitratın kadmiyum veya nitrat redüktaz ile nitrite indirgenmesi ve Griess reaksiyonu ile nitrit üretiminin saptanmasıdır. Kolorimetrik Griess reaksiyonu ile vücut sıvılarında NOx saptanması sıklıkla kullanılmaktadır<sup>22-24</sup>. Kronik hepatitlerde NOx düzeyindeki artışın etyolojye göre değişebildiği bildirilmektedir<sup>12</sup>. Ayrıca hepatoselüler oksidan-antioksidan dengesinin bozulması kronik viral enfeksiyonlardaki karaciğer hasarına katkıda bulunabilir<sup>4</sup>.

Sonuç olarak, her ne kadar bu çalışmada KHB hastalarında serum NO düzeyleri kontrollere göre daha yüksek bulunmuş olsa da, NO'nun hastalık patogenezindeki rolünün aydınlatılması için in vivo koşullarda ve hücresel düzeyde ileri araştırmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Aksoy A, Ozdarendeli A. Genotyping of hepatitis B virus by restriction enzyme analysis. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 215-23.
2. Lake-Bakaar G, Sorbi D, Mazzocchi V. Nitric oxide and chronic HCV and HIV infections. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1072-6.
3. Ahn B, Han BS, Kim DJ, Ohshima H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1337-44.
4. Monzon CG, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Otero RM. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000; 32: 331-8.
5. Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 275-95.
6. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterol* 2004; 126: 903-13.
7. Koulentaki M, Notas G, Petinaki E, et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines in acute hepatitis B. *Eur J Intern Med* 2004; 15: 35-8.

8. Chang WW, Su JJ, Lai MD, Chang WT, Huang W, Lei HY. The role of inducible nitric oxide synthase in a murine acute hepatitis B virus (HBV) infection model induced by hydrodynamics-based in vivo transfection of HBV-DNA. *J Hepatol* 2003; 39: 834-42.
9. Guidotti LG, McClary H, Moorhead Loudis J, Chisari FV. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med* 2000; 191: 1247-52.
10. Navarro-Gonzalves JA, Garcia-Benayes C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44: 679-81.
11. Amaro MJ, Bartolome J, Lopez-Farre A, Pardo M, Carreno V. Decreased nitric oxide production in chronic hepatitis B and C. *J Med Virol* 1997; 51: 326-31.
12. Pârvu AE, Negrean V, Plesca-Manea L. Nitric oxide in patients with chronic liver diseases. *Rom J Gastroenterol* 2005; 4: 225-30.
13. Atik E, Onlen Y, Savas L, Doran F. Inducible nitric oxide synthase and histopathological correlation in chronic viral hepatitis. *Int J Infect Dis* 2007; 12: 12-5.
14. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 1761-6.
15. Sanz-Cameno P, Medina J, Garcia-Buey L, et al. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2002; 37: 723-9.
16. Sulowska Z, Pietruszynski R, Dworniak D, Tchorzewski H, Sidorkiewicz M. Oxidative burst response of neutrophils primed with PreS1 antigen of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B and convalescents. *J Viral Hepat* 1996; 3: 293-9.
17. Kandemir Ö, Polat A, Kaya A. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis and its relation with histological severity of disease. *J Viral Hepat* 2002; 9: 419-23.
18. Ersoy Y, Bayraktar NM, Mizrak B, et al. The level of endothelin-1 and nitric oxide in patients with chronic viral hepatitis B and C and correlation with histopathological grading and staging. *Hepatol Res* 2006; 34: 111-6.
19. Amaro MJ, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999; 29: 915-23.
20. Okamoto T, Yamamura K, Hino O. Expression of the inducible form of the nitric oxide synthase gene in the livers of mice with chronic hepatitis. *Int J Mol Med* 2000; 6: 315-7.
21. Shao J, Wei L, Wang H, et al. Relationship between hepatitis B virus DNA levels and liver histology in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2007; 3: 2104-7.
22. Bulut Y, Ozugurlu AF. Follow-up of nitric oxide levels in acute hepatitis B patients. *Mikrobiyol Bul* 2002; 36: 283-9.
23. Sastry KV, Moudgal RP, Mohan J, Tyagi JS, Rao GS. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. *Anal Biochem* 2002; 306: 79-82.
24. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol* 2008; 440: 361-80.