

HEPATİT B VİRUS ENFEKSİYONLU HASTALARDA OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDAN KAPASİTENİN ARAŞTIRILMASI VE İNTERFERON- α -LAMİVUDİN KOMBİNASYON TEDAVİSİNİN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ*

INVESTIGATION OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT DEFENSE IN PATIENTS WITH HEPATITIS B VIRUS INFECTION AND THE EFFECT OF INTERFERON- α PLUS LAMIVUDINE COMBINATION THERAPY ON OXIDATIVE STRESS

Ali ACAR¹, Levent GÖRENEK², Ahmet AYDIN³, Can Polat EYİGÜN², Ayşe EKEN³, Ahmet SAYAL³, Alaaddin PAHSA²

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul. (draliacar@yahoo.com)

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi, Eczacılık Bilimleri Merkezi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Çalışmamızın amacı; akut ve kronik hepatit B virus (HBV) enfeksiyonlu hastalarda oluşan karaciğer hasarında oksidatif stresin rolünü ve buna karşı oluşan antioksidan enzim sisteminin etkinliğini belirlemektir. Ayrıca çalışmada, interferon- α (IFN- α) ve lamivudin kombinasyon tedavisinin oksidatif stres üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya akut HBV (AHBV) enfeksiyonu olan 19, inaktif HBsAg taşıyıcısı (HBVT) olan 24, kronik HBV (KHBV) enfeksiyonu olan 17 hasta ile 21 sağlıklı kontrol grubu alınmıştır. Kontrol ve hasta gruplarında, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri, eritrosit malondialdehit (MDA) seviyeleri, eritrosit süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçülmüştür. KHBV grubunda, 6 ay süreyle IFN- α ve lamivudin kombinasyon tedavisi sonrasında bu parametrelere tekrar bakılmıştır. Eritrosit MDA seviyeleri; tüm hasta gruplarında kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmiştir ($p < 0.05$). CuZn-SOD aktivitesi; AHBV grubunda diğer tüm gruplara göre yüksek ($p < 0.05$), tedavi öncesi KHBV grubunda ise tüm gruplara göre düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). GSH-Px aktivitesi; AHBV grubunda, HBVT ve tedavi öncesi KHBV gruplarına göre yüksek

* Bu çalışma 11. Balkan Askeri Tıp Kongresi'nde (18-22 Haziran 2006, Atina, Yunanistan) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

($p < 0.05$) bulunmuştur. Tedavi öncesi KHBV grubunda GSH-Px aktivitesi tüm gruplara göre düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). KHBV grubunda tedavi sonrası MDA seviyelerinde tedavi öncesine göre anlamlı düzeyde azalma saptanırken ($p < 0.05$), CuZn-SOD ve GSH-Px aktivitelerinde tedavi öncesine göre anlamlı düzeyde artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Tedavi öncesi ve sonrası, MDA değerleri ile serum ALT seviyeleri arasında anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) pozitif korelasyon saptanmıştır. Tüm hasta gruplarında lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyelerinde artış saptanması, HBV enfeksiyonunda oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Eritrosit MDA seviyeleri ile serum ALT seviyeleri arasında korelasyonun olması, oksidatif stresin HBV enfeksiyonunun patogeneğinde yer aldığı hipotezini desteklemektedir. KHBV ve HBVT gruplarında, antioksidan kapasitedeki yetersizlik, hastalığın şiddetlenmesi ve fibrozis ile sonuçlanmasına neden olabilir. IFN- α ve lamivudin tedavisi, lipit peroksidasyon ürünlerinde azalmaya ve antioksidan enzimlerde artışa neden olarak antioksidan etkinlik göstermektedir. Sonuç olarak, KHBV tedavisinde IFN- α ve lamivudine ek olarak, antioksidan ajanların kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmekle birlikte bu konuyla ilgili geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Viral hepatit B, oksidatif stres, reaktif oksijen türleri, malondialdehit, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, interferon- α , lamivudin.*

ABSTRACT

The aim of our study is to determine the role of oxidative stress on hepatic damage in patients with acute and chronic hepatitis B virus (HBV) infection and the efficacy of antioxidant-enzyme system against oxidative stress. Furthermore, the effect of interferon- α (IFN- α) plus lamivudine therapy on oxidative stress was also investigated. Nineteen patients with acute hepatitis B virus (AHBV) infection, 17 patients with chronic hepatitis B virus (CHBV) infection, 24 inactive HBsAg carriers and 21 healthy controls were included in the study. In control and patient groups, serum alanine-aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels, erythrocyte malondialdehyde (MDA) levels, erythrocyte superoxide dismutase (CuZn-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were measured. In CHBV group, after IFN- α plus lamivudine therapy for 6 months, these parameters were measured again. In all patient groups erythrocyte MDA levels were detected higher than control group ($p < 0.05$). Activity of CuZn-SOD was found to be the highest in AHBV ($p < 0.05$), and the lowest before the treatment in CHBV group ($p < 0.05$) compared with other groups. Activity of GSH-Px was found to be the highest in AHBV compared with inactive HBsAg carriers ($p < 0.05$) and CHBV group before treatment ($p < 0.05$). Activity of GSH-Px was found to be the lowest in CHBV group before treatment compared with other groups ($p < 0.05$). In CHBV group there was a significant decrease of MDA levels after treatment ($p < 0.05$) while there was a significant increase in activity of CuZn-SOD and GSH-Px compared with pretreatment levels ($p < 0.05$). A significant positive correlation was determined between MDA values and serum ALT levels, before and after the treatment ($p < 0.05$). Detection of the increase of MDA levels which is a product of lipid peroxidation in all patient groups, indicates that the oxidative stress is increased in HBV infection. Correlation between the levels of erythrocyte MDA levels and serum ALT levels supports the hypothesis concerning the role of oxidative stress in pathogenesis of HBV infection. Insufficiency of antioxidant capacity in CHBV and inactive HBsAg carrier groups may lead to progression of disease and results in fibrosis. Treatment with IFN- α plus lamivudine causes a decrease in products of lipid peroxidation and shows antioxidant activity via increasing the antioxidant enzymes. These data suggest that the addition of antioxidant agents to IFN- α and lamivudin combination therapy may be useful in CHBV treatment. Further in-vitro and in-vivo studies are required to enlighten the role of antioxidants on HBV disease progression and treatment.

Key words: *Viral hepatitis B, oxidative stress, reactive oxygen species, malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, interferon- α , lamivudin.*

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), dünya genelinde 350 milyondan fazla kişide kronik enfeksiyona yol açan önemli bir halk sağlığı problemidir¹. HBV enfeksiyonunun şifayla veya hastalıkla sonlanmasının esas itibarıyla konağın immün yanıtına bağlı olduğu düşünülmekle beraber², fulminan hepatit gelişimi, kronikleşme ve hepatoselüler kanser (HSK) gelişimindeki mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresin, viral hepatit patogenezinde ilerleyici karaciğer hasarı ve malignite gelişiminde önemli etkinliğe sahip olduğu ileri sürülmektedir³⁻⁸.

Viral hepatit seyrinde, inflamasyon bölgesindeki Kupffer hücreleri ve diğer aktive makrofajlar tarafından ortama salınan reaktif oksijen türlerinin, hücre membranı lipitlerinde peroksidasyona yol açarak aldehit ürünlerinin ortaya çıktığı, bunların da Stellat (ito) hücrelerini direkt olarak aktive ederek miyofibroblastlara transforme ettiği ve bunun sonucunda da kollajen sentezinde artış ve fibrozis geliştiği ileri sürülmektedir⁹⁻¹¹. Reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerini göstermede ana mekanizma membran fosfolipitlerinin peroksidasyonudur^{12,13}. Lipit peroksidasyonu (LP) son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) tayini, oksidatif stresin ve neden olduğu hücresel hasarın derecesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir¹²⁻¹⁴. Organizmada reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Hücresel seviyede etkili olan antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz (CuZn-SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) en önemlileridir¹⁵.

Kronik HBV (KHBV) enfeksiyonu patogenezinde oksidatif stresin rolünü araştıran çalışmalar olmasına rağmen^{8,13,15,16}, akut HBV (AHBV) enfeksiyonu, inaktif HBsAg taşıyıcılığı (HBVT) ve KHBV enfeksiyonu olgularını kapsayacak şekilde HBV enfeksiyonun tüm formlarını ve KHBV olgularında tedavi öncesi ve sonrası oksidatif stres ve antioksidan kapasiteyi aynı çalışma içinde inceleyen araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada; HBV enfeksiyonu patogenezinde oksidatif stresin rolünü ortaya koymak için AHBV, HBVT, KHBV enfeksiyonu olan hastalar ile sağlıklı bireylerde ertirosit MDA seviyeleri ile antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak, KHBV olgularında interferon (IFN)-lamivudin kombinasyon tedavisi sonrası bu parametrelere tekrar bakılarak antiviral tedavinin oksidatif stres ve antioksidan kapasite üzerine etkisi, ayrıca tedavi öncesi ve sonrası MDA ile transaminaz değerleri arasındaki ilişki incelenerek, takip parametresi olarak MDA'nın değeri irdelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ocak 2002 ile Şubat 2004 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Eczacılık Bilimleri Merkezi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışmada AHBV, HBVT ve KHBV enfeksiyonlu olgularda (tedavi öncesi ve sonrası) ve kontrol grubu olarak gönüllü sağlıklı bireylerde, LP ürünü olan MDA ve antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px düzeyleri, yine araştırma grubuna dahil edilen bireylerde alanin amino-

transferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), direkt bilirubin (DB) ve indirekt bilirubin (İDB) seviyeleri araştırıldı. Bu amaçla çalışmaya 5 grup dahil edildi:

1. AHBV Enfeksiyonu Olan Hasta Grubu

Akut semptomları olan, DB ve İDB değerleri yüksek, ALT, AST seviyeleri normalden en az 4-5 kat yüksek, HBsAg ve anti-HBc IgM pozitif, yaş ortalaması 26.15 ± 8.3 yıl olan 17 (%89)'si erkek, 2 (%11)'si kadın 19 hastadan oluşmakta idi.

2. HBVT Hasta Grubu

En az 6 aydır takip edilen, hiçbir yakınması olmayan, HBsAg pozitifliği tesadüfi olarak saptanan (kan bağıışı, ailesinde HBsAg pozitifliği saptanan bireylerin taranması, aşı-lama öncesi serolojik inceleme), HBV-DNA'ları negatif, serum transaminazları normal, yaş ortalaması 37.08 ± 5.9 yıl olan 17 (%71)'si erkek, 7 (%29)'si kadın 24 olgudan oluş-makta idi.

3. KHBV Enfeksiyonu Olan Hasta Grubu (Tedavi Öncesi)

Altı aydan uzun süreli HBsAg ve HBeAg/anti-HBe pozitif, HBV-DNA pozitif, serum transaminaz değerleri yüksek, histopatolojik olarak KHBV enfeksiyonu tanısı almış yaş ortalaması 30.64 ± 5.76 yıl olan 15 (%88)'i erkek, 2 (%22)'si kadın 17 hastadan oluşmak-ta idi.

4. Tedavi Sonrası KHBV Enfeksiyonlu Hasta Grubu

Altı ay süreyle IFN- α 4.5-5 milyon U/gün ve lamivudin 1 x 100 mg/gün kombinasyon tedavisi alan KHBV hastalarından oluşmakta idi.

5. Kontrol Grubu

Hiçbir yakınması olmayan, önceden HBV ile karşılaşmamış (anti-HBc total, HBsAg ne-gatif), serum transaminazları normal, yaş ortalaması 27.57 ± 6.34 yıl olan 14 (%67)'ü erkek, 7 (%33)'si kadın 21 gönüllü sağlıklı bireyden oluşmakta idi.

Hasta ve kontrol grubundaki tüm olgularda hepatit C virus (HCV) ve insan immün yetmezlik virusu (HIV) serolojisi negatif olup, vitamin kullanımı, uzun süreli alkol ve ilaç alımı, madde bağımlılığı ve kronik bir hastalık öyküsü bulunmamakta idi.

Yöntem

Tripotasyum EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri MDA ve antioksidan sistem parametreleri çalışılmak üzere hemen 4°C 'de 4400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı ayrılarak geride kalan şekilli elemanlar üzerine hacminin 3 katı kadar %0.9'luk NaCl çözümü ilave edilerek hafifçe ters yüz edildi ve 4°C 'de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatant atıldı. Bu işlem 2 defa daha tekrar edildi, sonunda 1 ml eritrosit kısmından polipropilen tüplere alınarak üzerine 4 ml soğuk distile su ilave edilip vorteksenerek lizise uğrattıldı. Daha sonra -70°C derin dondurucuda analiz edilinceye kadar saklandı.

CuZn-SOD ve GSH-Px aktiviteleri, eritrosit lizatlarında "UV-VIS Recording Spectrophotometer (UV-2100S, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)"da Aydın ve arkadaşlarının¹⁷ tanımladığı yöntemle ölçüldü. CuZn-SOD ve GSH-Px aktivitesi değerleri U/ml olarak ifade edildi.

Lipit peroksidasyon, tiyobarbütirik asit ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ortaya çıkan renkli bir bileşiğin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan, Aydın ve arkadaşlarının¹⁷ tanımladığı yöntemle hesaplandı. MDA değerleri nmol/ml olarak ifade edildi.

Eş zamanlı olarak ALT, AST ve bilirubin düzeyleri Olympus AU 2700 (Olympus Diagnostic, Hamburg Germany) otoanalizörleri kullanılarak çalışıldı. HBsAg, HBeAg, anti-HBe, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İmmünoloji Bilim Dalı Laboratuvarlarında enzim immün yöntemi ile [enzyme immunoassay (EIA); Tecan Immunodiagnostic, Sevilla, Spain] ile, anti-HCV innotest kiti (Biogenetics, Zwijndrecht, Belgium) kullanılarak EIA yöntemi ile, anti-HBc IgM ve anti-HBc IgG EIA yöntemi ile (Wellcozyme, Murex Biotech Limited, UK and Biokit, S.A. Barcelona, Spain), anti-HIV EIA yöntemi ile (Wellcozyme Murex Biotech Limited, UK ve Murex Diagnostics S.A. Chatillon, France) çalışıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

Veriler, "SPSS 11.0 for Windows" paket programı kullanılarak değerlendirildi. Önce çalışmaya alınan parametrelerin ortalamaları, standart sapmaları ve dağılımları belirlendi. Daha sonra gruplardan sağlanan verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları test edildi. Verilerin tamamının normal dağılıma uyumlu olduğu görüldü ve parametrik testlerin uygulanması kararlaştırıldı. Bağımsız grupların karşılaştırılmasında Anova Post Hoc testlerinden Tukey analizi kullanılarak gruplar ikiye bölünerek karşılaştırıldı. Bağımlı gruplarda tedavi öncesi ve sonrası ölçülen parametreler Paired T-testi kullanılarak değerlendirildi. Parametreler arasında anlamlı ilişki olup olmadığını araştırmak için Pearson korelasyon testi kullanıldı. Sonuçlardan $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tüm gruplarda incelenen parametrelerin sonuçları Tablo I'de, gruplar arasındaki karşılaştırma Tablo II'de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek MDA değerinin AHBV grubunda olduğu, bunu sırasıyla KHBV, HBVT ve kontrol grubunun izlediği görülmüştür. Tedavi sonrası KHBV grubundaki MDA seviyelerinde tedavi öncesi KHBV grubuna göre anlamlı oranda azalma saptanmıştır. MDA açısından tüm gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Grupların antioksidan enzimler açısından değerlendirilmesinde, AHBV grubunda CuZn-SOD aktivitesinin tüm gruplara göre yüksek olduğu ($p < 0.05$), GSH-Px aktivitesinin ise tüm gruplara göre yüksek olmasına rağmen farkın HBVT ve KHBV gruplarına göre anlamlı iken ($p < 0.05$), kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. KHBV grubunda CuZn-SOD ve GSH-Px aktiviteleri, HBVT olgularına ve kontrol grubuna göre düşük ($p < 0.05$) saptanmıştır. HBVT grubunda CuZn-SOD ve GSH-Px aktiviteleri AHBV grubuna göre düşük ($p < 0.05$), KHBV grubuna göre yüksek ($p < 0.05$), kontrol grubuna göre ise dü-

Tablo I. Çalışılan Parametrelerin Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Sonuçları

Parametreler	Gruplar				
	Kontrol (Ort. \pm SS)	AHBV (Ort. \pm SS)	HBVT (Ort. \pm SS)	TÖ-KHBV (Ort. \pm SS)	TS-KHBV (Ort. \pm SS)
MDA (nmol/ml)	3.8 \pm 0.98	9.6 \pm 1.6	5.0 \pm 1.04	7.2 \pm 1.4	5.03 \pm 0.97
CuZn-SOD (U/ml)	269.5 \pm 87.4	394.9 \pm 61.2	262.8 \pm 68.5	180.3 \pm 45.1	308.6 \pm 89.9
GSH-Px (U/ml)	7.6 \pm 1.2	8.6 \pm 1.5	6.9 \pm 1.2	5.2 \pm 1.3	8.9 \pm 1.5
ALT U/L	20.8 \pm 6.3	1501.3 \pm 852.8	31.25 \pm 12.54	163.4 \pm 127.9	38.9 \pm 33.5
AST U/L	21.7 \pm 4.5	824.5 \pm 809.9	25.9 \pm 9.3	73.3 \pm 46.3	33.7 \pm 22.0

MDA: Malondialdehit, CuZn-SOD: Süperoksit dismutaz, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, AHV: Akut HBV enfeksiyonu olguları, HBVT: İnaktif HBsAg taşıyıcıları, TÖ-KHBV: Tedavi öncesi kronik HBV enfeksiyonu olguları, TS-KHBV: Tedavi sonrası kronik HBV olguları, Ort: Ortalama; SS: Standart sapma, HBV: Hepatit B virusu.

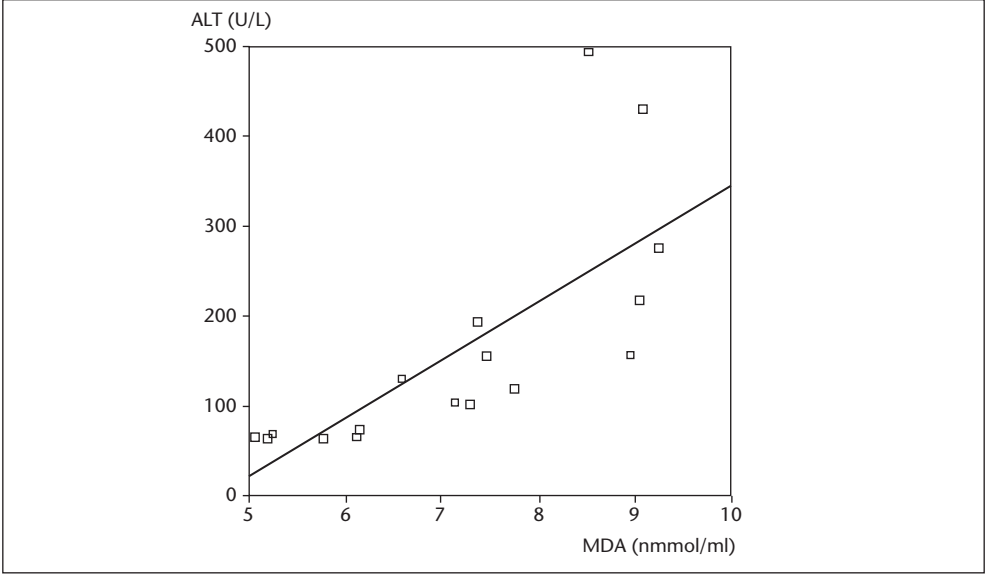
Tablo II. Malondialdehit, Antioksidan Enzim Aktiviteleri, ALT, AST Değerlerinin Tüm Gruplar Arasında İkişerli Karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar						
	KG-AHBV	KG-HBVT	KG-KHBV	AHBV-HBVT	AHBV-KHBV	HBVT-KHBV	TÖ-KHBV-TS-KHBV
MDA (nmol/ml)	< 0.01	0.009	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
CuZn-SOD (U/ml)	< 0.001	0.988	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001
GSH-Px (U/ml)	0.057	0.347	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
ALT U/L	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002
AST U/L	< 0.001	0.055	< 0.001	< 0.001	0.001	0.001	0.013

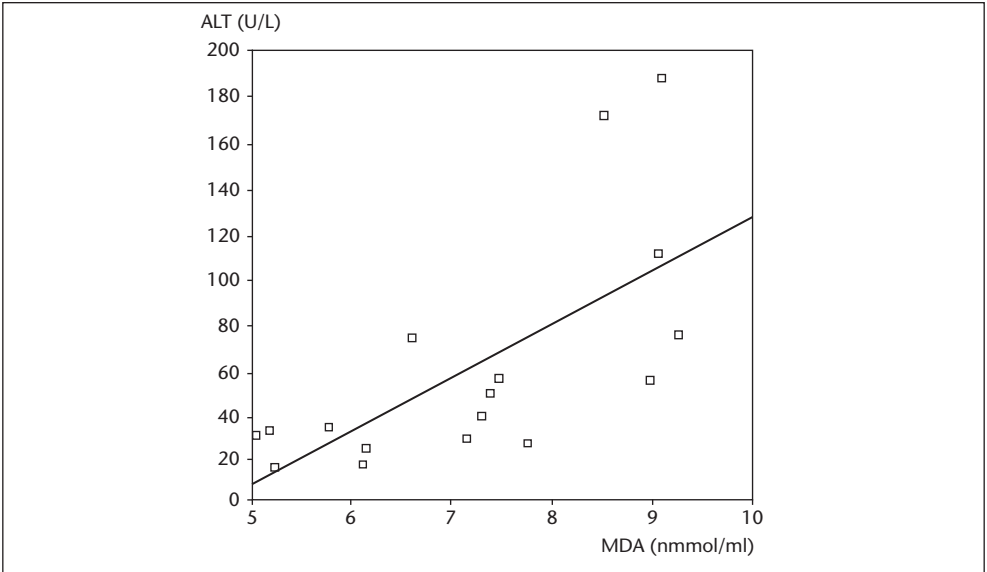
MDA: Malondialdehit, CuZn-SOD: Süperoksit dismutaz, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, KG: Kontrol grubu, AHV: Akut HBV enfeksiyonu olguları, HBVT: İnaktif HBsAg taşıyıcıları, TÖ-KHBV: Tedavi öncesi kronik HBV enfeksiyonu olguları, TS-KHBV: Tedavi sonrası kronik HBV olguları.

şük ($p > 0.05$) olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. KHBV grubunda; INF- α ve lamivudin tedavisinden sonra MDA, antioksidan enzimler ve transaminaz parametreleri tekrar değerlendirildiğinde, MDA değerlerinde anlamlı düzeyde düşüş saptanırken ($p < 0.05$), SOD ve GSH-Px aktivitelerinde ise anlamlı düzeyde artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Serum transaminaz değerlerinde, tedaviden sonra anlamlı olarak düşüş belirlenmiştir ($p < 0.05$).

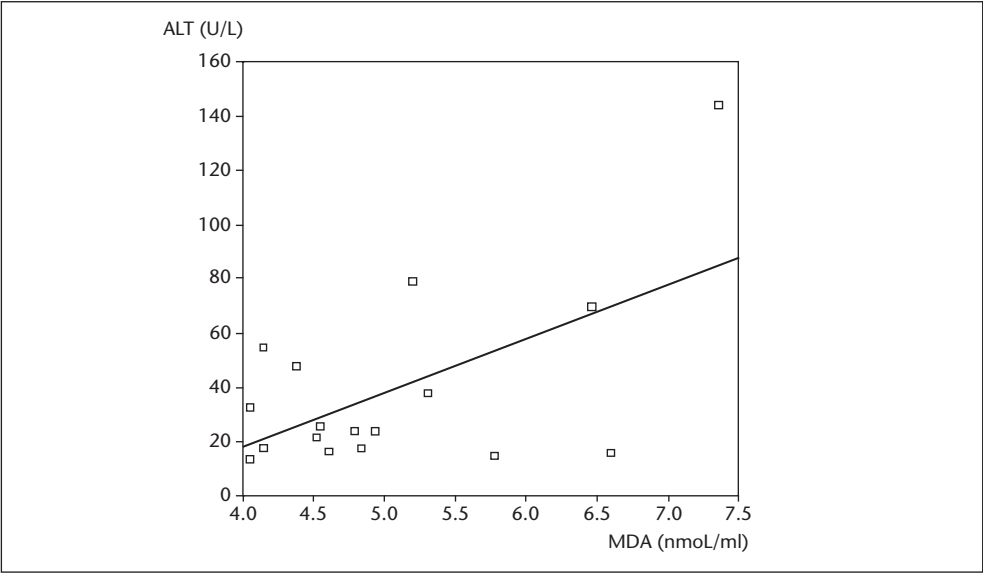
KHBV'li hastalarda, tedavi öncesi ve sonrası MDA değerleri ile serum ALT ve AST aktiviteleri arasında korelasyon incelendiğinde; tedavi öncesi MDA-ALT, tedavi öncesi MDA-AST, tedavi sonrası MDA-ALT arasında olumlu yönde, iyi derecede (sırasıyla $r_1 = 0.737$, $r_2 = 0.674$, $r_3 = 0.581$), istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) korelasyon saptanmıştır (Şekil 1-3). Tedavi sonrası MDA ile AST arasında ise olumlu yönde, orta derecede ($r = 0.339$) istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p > 0.05$) korelasyon saptanmıştır. MDA seviyeleri ile ALT düzeleri arasındaki korelasyon, MDA-AST arasındaki korelasyondan daha güçlü bu-



Şekil 1. Tedavi öncesi-KHBV'li olgularda MDA değerleri ile ALT aktiviteleri arasındaki ilişki. Tedavi öncesi-KHBV olgularında eritrosit MDA değerleri ile serum ALT seviyeleri arasında olumlu yönde, iyi derecede, istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r= 0.737$, $p< 0.05$). MDA: Malondialdehit; ALT: Alanin aminotransferaz, KHBV: Kronik hepatit B virusu.



Şekil 2. Tedavi öncesi-KHBV'li olgularda MDA değerleri ile AST aktiviteleri arasındaki ilişki. Tedavi öncesi-KHBV olgularında eritrosit MDA değerleri ile serum AST seviyeleri arasında olumlu yönde, iyi derecede, istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r= 0.674$, $p< 0.05$). MDA: Malondialdehit, AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, KHBV: Kronik hepatit B virusu.



Şekil 3. KHBV'li hastalarda IFN- α ve lamivudin kombinasyon tedavisi sonrasında MDA değerleri ile ALT aktiviteleri arasındaki ilişki. Tedavi sonrası-KHBV olgularında eritrosit MDA değerleri ile serum ALT seviyeleri arasında olumlu yönde, iyi derecede, istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r= 0.581$, $p< 0.05$). MDA: Malondialdehit, ALT: Alanin aminotransferaz, KHBV: Kronik hepatit B virusu.

lunmuştur. SOD ve GSH-Px aktiviteleri ile serum transaminazları arasında, tedavi öncesi ve sonrası korelasyon saptanmamıştır ($p> 0.05$).

TARTIŞMA

HBV ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülmekte olup, kronik karaciğer hastalığı ve onun komplikasyonlarının en önemli nedenidir. Primer HSK, tüm dünyada en yaygın kanser türlerinden birisi olup, HSK'lerin yaklaşık %50'si KHBV enfeksiyonu ile ilişkilidir¹⁸.

Virusların oluşturduğu karaciğer hasarında ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin ana kaynağı mitokondri ve sitokrom P 450 enzim sistemleridir⁴. Genel olarak HBV enfeksiyonunda, karaciğere infiltre olmuş fagositlerden, Kupffer hücrelerinden ve/veya sitokinle uyarılmış hemen tüm karaciğer hücrelerinden reaktif oksijen türleri üretilmektedir¹⁹. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarındaki ana mekanizma LP'dir. Bunun yanında, karaciğer hücrelerinde Ca^{++} ve Na^+ iyonlarının birikimine, nitrit oksit sentezinde artışa, sitokinler, büyüme faktörleri ve kollajen gen ekspresyonlarında artışa ve DNA kırılmalarına neden olarak, normal hücre redoks potansiyelinde ve metabolizmasında bozulma meydana getirir. Normal hücre fonksiyon ve aktivitesinin süregen olarak bozulması da hücrelerde geri dönüşemeyen hasar oluşmaktadır⁴. Böylelikle reaktif oksijen türleri direkt olarak apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olur^{4,19}. Ayrıca antiproteazların inaktivasyonu ile proteaz aktivitesinde devamlılığı sağlayarak ve adezyon molekülleri ve inflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu modüle ederek, indirekt etkileriyle de inflamatuvar karaciğer hastalıklarının patogenezinde yer alır¹⁹.

Çalışmamızda, HBV enfeksiyonlu hastalarda oksidatif stresin varlığını belirlemek amacıyla MDA, oksidatif strese karşı organizmanın antioksidan enzim kapasitesini saptamak amacıyla da SOD ve GSH-Px tayini yapılmıştır. AHBV, HBVT ve KHBV hastalarında LP ürünlerinden olan MDA'nın eritrosit düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Buna karşın kronik olgularda antioksidan enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre düşüklük saptanırken, akut olgularda ise tüm gruplara göre yükseklik saptanmıştır. Hasta gruplarında MDA'nın artmış olması HBV enfeksiyonu patogenezinde oksidatif stresin varlığını göstermektedir.

AHBV ve KHBV enfeksiyonlu hastalarda oksidatif strete artış olduğunu gösteren birçok çalışma vardır^{7,8,13,15,16}. AHBV grubundaki MDA seviyelerinin tüm gruplara göre daha yüksek olması, hücrel immün yanıtın ve inflamasyonun bu olgularda daha şiddetli olmasına bağlı olarak oksidatif strete artışa yol açtığı şeklinde açıklanabilir. AHBV enfeksiyonunda artmış oksidatif stres belki de olguların büyük bir çoğunluğunda virusun temizlenmesini açıklayabilir. Enfekte hücrelerin apoptotik sürecini başlatmaya yeterli olmayan oksidatif stres ise hastalığın kronikleşmesiyle sonuçlanıyor olabilir. Kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin biraz daha düşük düzeylerde olması tam tersine virusların çoğalmasını artırmaktadır. Buna sebep olarak, düşük oksidatif stresin NF-kappa B'yi uyarak mitojenik etki yapması, çoğalmakta olan hücrelerde ise virus replikasyonunun daha fazla olması gösterilmektedir^{20,21}. Ayrıca NF-kappa B'nin direkt olarak viral replikasyonu artırıcı etkisi de vardır⁶. Bu sebeple kronik viral hepatitlerde aşırı olmayan ancak sürekli olan oksidatif stres, konak hücre DNA'sını etkileyerek mutasyonlara neden olmakta, fibroblastik aktiviteyi uyarmakta ve uzun bir süre sonra da siroz, HSK gibi komplikasyonlar meydana gelmektedir²².

KHBV grubunda SOD ve GSH-Px aktivitelerinde azalma, antioksidan bariyerdeki yetersizliğin göstergesidir. Kronik viral hepatitlerde antioksidan enzim kapasitesinde azalma olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir^{3,7,8,16,23-26}. Enzim aktivitesindeki azalma, HBV'nin direkt inhibisyonuna ve/veya enzim miktarında tükenmeye ve/veya sentezindeki yetersizliğe bağlı olabilir. Ayrıca, serbest radikaller antioksidan enzim biyosentezinde inhibitör etki yapmaktadır⁶. Antioksidan enzimlerdeki yetersizlik neticesinde reaktif oksijen türleri nötralize edilemez ve ortamda aşırı birikmeleri sonucunda da karaciğer hasarı gelişmektedir¹⁹. Sonuç olarak, KHBV enfeksiyonunda serbest radikal oluşumu organizmanın antioksidan nötralizan kapasitesini aşmakta, bu durum lipit ve protein oksidasyonuna yol açmaktadır. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan karbonil bileşiklerinden MDA ölçümü, oksidatif stresin oluşturduğu doku hasarının göstergesidir. Eritrosit MDA seviyeleri ölçülerek karaciğer hasarının varlığı gösterilebilir.

Çalışmamızda AHBV grubunda oksidatif strete artış (eritrosit MDA seviyelerinde artış) saptanırken, KHBV ve HBVT gruplarından farklı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde yükseklik saptanmıştır. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, Karabulut ve arkadaşları²⁷ akut HCV enfeksiyonlu olgularda eritrosit SOD aktivitesini kontrole göre yüksek, kronik HCV grubunda ise düşük bulmuşlardır. Nagoev²⁸ ve Kovelonor'un²⁹ yaptıkları çalışmalarda,

AHBV olgularında LP aktivitesinde artış olduğu, hastalığın şiddeti ile LP aktivitesindeki artışın korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Antonova ve arkadaşları³⁰; AHBV'li olgularda lenfosit membranlarında SOD aktivitesini kontrole göre yüksek bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre viral hepatitlere karşı gelişen akut immün yanıt sonucu karaciğerde oksidatif stres artmaktadır. Organizma buna karşı antioksidan enzimlerini artırarak karşı koymaya çalışmaktadır. Enfeksiyonun kronikleşmesi durumunda ise antioksidan enzim miktarı giderek azalmakta, süregelen hale gelen oksidatif stres sonucu fibrozis ve malignite gelişebilmektedir.

Literatürde inaktif HBsAg taşıyıcılarında oksidatif stres ve antioksidan kapasiteyi inceleyen çalışma son derece kısıtlıdır ve sadece Bölükbaş ve arkadaşlarının⁷ çalışmalarına rastlanmıştır. Bu çalışmada inaktif HBsAg taşıyıcılarında oksidatif stres indeksinde artış saptanırken, antioksidan kapasitenin değişmediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde inaktif HBsAg taşıyıcılarında MDA seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, antioksidan enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre düşük ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. HBVT olgularında MDA seviyelerinin yüksekliğinin kronik olgulardaki kadar olmaması, sağlıklı bireylere göre ise daha yüksek olması nekroinflamasyonun patogeneğinde oksidatif stresin varlığını desteklemektedir. Karaciğer hasarının dolaylı bir serum göstergesi olarak kabul edilen ALT ve AST aktivitelerinin normal seviyelerde seyretmesine rağmen, MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olması, az da olsa bu olgularda karaciğer hasarının bulunduğunu göstermektedir. MDA seviyelerinin takibi karaciğer hasarını göstermede serum ALT ve AST ölçümünden daha iyi bir gösterge olabilir.

KHBV grubunda, INF- α ve lamivudin kombinasyon tedavisi öncesi ve sonrası MDA, SOD, GSH-Px, ALT, AST, değerleri karşılaştırıldığında; tedavi sonrası MDA değerleri ile ALT ve AST düzeylerinde azalma ($p < 0.05$), antioksidan enzim aktivitelerinde artma ($p < 0.05$) saptanmıştır. Bu bulgu, HBV enfeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında oksidatif stresin rolü olduğu görüşünü desteklemektedir. Kronik hepatitlerde antiviral tedavinin oksidatif stres üzerine etkisini inceleyen çalışmalar çoğunlukla HCV enfeksiyonu ile sınırlıdır^{3,31,32}. KHBV olgularında, antiviral tedavinin oksidatif stres ve antioksidan kapasiteye etkisini inceleyen araştırmalar sınırlı sayıda olup, literatürde sadece Dikici ve arkadaşlarının⁸ çalışmalarına rastlanmıştır. Bu çalışmada da bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, KHBV hastalarındaki artmış olan oksidatif stres parametrelerinde IFN- α tedavisi sonrasında azalma, antioksidan kapasitede ise artış saptanmıştır. IFN- α ve lamivudin kombinasyon tedavisi sonrası serum ALT aktivitesi hızlı şekilde normale dönerken, eritrosit MDA seviyesindeki anlamlı azalmaya karşın, hiçbir zaman sağlıklı kontrol grubu değerlerine düşmemektedir. Bu bulgu; inflamatuvar hücrelerin LP'ye neden olarak karaciğer hasarının oluşmasında en önemli etken olduğu görüşünü desteklemektedir.

KHBV'li hastalarda tedavi öncesi MDA değerleri ve ALT ve AST aktiviteleri arasında iyi derecede korelasyon saptanmıştır. Tedavi sonrası-KHBV grubunda MDA değerleri ile ALT aktiviteleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.05$), MDA-AST arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). MDA seviyesi ile

karaciğer hasarının serum göstergesi olan ALT ve AST aktiviteleri arasında pozitif korelasyonun olması, nekroinflamasyonun patogenezinde LP'nin rol aldığı hipotezini desteklemektedir.

Demirdağ ve arkadaşları¹⁶; KHBV olgularında, serum MDA seviyeleri ile serum ALT, AST aktiviteleri arasında korelasyon saptamışlar, serum MDA seviyelerinin karaciğer hasarını tespit etmede kullanılabileceğini belirtmişlerdir. De Maria ve arkadaşları³³; 20 KHCV olgu grubunda MDA seviyelerini serum ve karaciğer örneklerinde yüksek tespit etmişlerdir. Kronik aktif hepatitli hastalardaki MDA seviyelerinin sirotik gruba göre daha yüksek olduğunu ve MDA ile ALT seviyeleri arasında korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir. Romero ve arkadaşlarının³² yaptıkları çalışmada, KHCV'li hastaların, karaciğer biyopsisi ile saptanan histolojik bulguları ile biyopsi yapıldığı esnada alınan serum örneklerindeki MDA ve ALT seviyesi arasındaki ilişki incelendiğinde; histopatolojik olarak karaciğer hasarının şiddeti ile serum MDA seviyesi arasında, serum ALT seviyesinden çok daha anlamlı bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir. İnflamatuvar histopatolojik bulguların şiddeti ile serum MDA seviyeleri korelasyon gösterirken, serum ALT aktivitesi ile bu denli bir korelasyon olmaması, karaciğer hasarında ve LP oluşmasında karaciğerdeki veya dolaşımdaki inflamatuvar hücrelerin asıl rolü üstlendiğini düşündürmektedir. Aynı çalışmada, histopatolojik olarak IFN- α tedavisine yanıt veren ve vermeyen olguların tedavi öncesi MDA değerleri karşılaştırıldığında, yanıt verenlerde MDA değerleri daha yüksek bulunmuştur. Tedavi öncesi MDA seviyeleri ölçülerek tedaviye yanıt oranının tahmin edilmesinde ve klinik takipte MDA seviyelerinin ölçülmesi önerilmiştir.

Sonuç olarak, HBV ile enfekte olgularda oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyelerinde artış, oksidatif stresin HBV enfeksiyonunun patogenezinde yer aldığını göstermektedir. KHBV olgularında SOD ve GSH-Px aktivitelerindeki azalma ise bu olgularda antioksidan bariyerdeki yetersizliğin göstergesidir. ALT ve AST aktivitelerinin HBVT olgularında normal seviyelerde seyretmesine rağmen MDA seviyelerinin kontrole göre yüksek olması, az da olsa bu olgularda karaciğer hasarının varlığını ve MDA'nın karaciğer hasarını göstermede transaminazlardan daha hassas olduğunu vurgulamaktadır. KHBV'de daha düşük düzeyli, ancak sürekli olan oksidatif stres, sonuçta fibrozis, siroz ve HSK'ya neden olabilmektedir. Aynı zamanda kronik olgularda antioksidan kapasitenin azalması, hastalığın şiddetlenmesine ve fibrozis ile sonuçlanmasına neden olabilir. IFN ve lamivudin tedavisi LP'de azalmaya ve antioksidan enzim aktivitelerinde artışa neden olmaktadır. Sonuç olarak, seçilmiş olgularda IFN- α ve lamivudin tedavisine ek olarak antioksidan ajanların kullanımının faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-39.
2. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 23-61.
3. Levent G, Ali A, Ahmet A, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patient with chronic hepatitis C patients before and pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Transl Med* 2006; 20: 25.

4. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1-10.
5. Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002; 40: 1213-32.
6. Schwarz KB. Oxidative stress during viral infection. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 641-9.
7. Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis* 2005; 31: 95.
8. Dikici I, Mehmetoglu I, Dikici N, Bitirgen M, Kurban S. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-alpha treatment. *Clin Biochem* 2005; 38: 1141-4.
9. Jain SK, Pemberton PW, Smith A, et al. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol* 2002; 36: 805-11.
10. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 297-306.
11. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 49-98.
12. Bianchi G, Marchesini G, Fabbri A, Ronchi M, Chianese R, Grossi G. Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 784-8.
13. Lebensztejn DM, Chwiecko M, Semeniuk J, Kaczmarek M, Farbiszewski R. The role of free oxygen radicals in children with chronic viral hepatitis B. *Rocz Akad Med Białymst* 1995; 40: 667-72.
14. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
15. 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.
16. Demirdag K, Yilmaz S, Ozdarendeli A, Ozden M, Kalkan A, Kilic SS. Levels of plasma malondialdehyde and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 766-70.
17. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34: 65-70.
18. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 963: 13-20.
19. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 718-24.
20. Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7721-30.
21. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006; 5: 14.
22. Peterhans E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral disease. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56: 107-16.
23. Swietek K, Juszczyk J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 1997; 4: 139-41.
24. Yadav D, Hertan HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni CS. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2634-9.
25. Par A, Roth E, Rumi G Jr, Kovacs Z, Nemes J, Mozsik G. Oxidative stress and antioxidant defense in alcoholic liver disease and chronic hepatitis C. *Orv Hetil* 2000; 141: 1655-9.
26. Kaya S, Sütüçü R, Sesli Cetin E, Cicioğlu Aridoğan B, Aktürk O, Delibaş N. The relationship between viral load and malondialdehyde and antioxidant enzymes in patients with hepatitis C virus infection. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 55-61.
27. Karabulut AB, Bayındır Y, Öztürk Ç, Sönmez E, Batçoğlu K, Gözükara E. Hepatit C'li hastaların eritrositlerinde süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg* 2002; 1: 447-50.
28. Nagoev BS, Abidov MT, Ivanova MR. LPO and free-radical oxidation parameters in patients with acute viral hepatitis. *Bull Exp Biol Med* 2002; 134: 557-8.
29. Kovelonov Alu, Lobzin IuV, Mikhal'tsov AN, Malkov AN. Clinical and laboratory features of severe forms of acute viral hepatitis B. *Ter Arkh* 2003; 75: 17-23.

30. Antonova TV, Nikolaenko SL. Intensity of the peroxidation of membrane lipids and metabolism of lymphocytes in viral hepatitis patients. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1998; 5: 64-7.
31. Mutlu-Turkoglu U, Ademoglu E, Turkoglu S, Badur S, Uysal M, Toker G. The effects of interferon-alpha on serum lipid peroxidation and total thiol content in patients with chronic active hepatitis C. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 96: 357-61.
32. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum MDA: possible use for clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 993-7.
33. De Maria N, Colantoni A, Faggioli S, et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996; 2: 1291-5.