

Hepatit B Virus İle İnfekte Hastalarda Viral Yük İle Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzimler Arasındaki İlişki

Relationship Between Viral Load and Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Patients Infected with Hepatitis B Virus

Selçuk Kaya*

Salih Ankan*

Recep Sütçü**

Buket Cicioğlu Andoğan*

Emel Sesli Çetin*

Nigar Yılmaz**

Namık Delibaş**

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
*Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, **Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, hepatit B virus (HBV) ile infekte hastalarda viral yük ile antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu (LPO) arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: HBV enfeksiyonunun serolojik ve moleküler belirteçlerine sahip, antiviral tedavi almamış, 26'sı erkek ve 24'ü kadın 50 kişi hasta grubu olarak çalışmaya alınıp, viral yüklerine göre alt gruplara ayrıldı. Çalışmada kontrol grubu HBV enfeksiyonu olmayan ve daha önce de geçirmemiş, antiviral tedavi almamış 20'si erkek ve 20'si kadın 40 kişi sağlıklı gönüllüden oluşturuldu. Tüm hasta gruplarında ve kontrol gruplarında eritrosit katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ile serum malondialdehid (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: HBV'lu hasta gruplarında SOD 1060.75 U/g Hb, GSH-Px 17.95 U/g Hb, CAT 15.81 kU/g Hb, MDA 0.91 nmol/ml ortalama değerleri elde edilirken, kontrol grubunda SOD 1334.54 U/g Hb, GSH-Px 77.12 U/g Hb, CAT 21.31 kU/g Hb, MDA 0.20 nmol/ml değerleri elde edilmiştir. HBV'lu hasta gruplarında kontrol grubuna göre GSH-Px ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmış, SOD aktivitesinde ise bir azalma gözlenmekle beraber bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca MDA seviyelerinde kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Viral yüklerine göre alt gruplar arasında eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri ve serum MDA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. İstatistiksel değerlendirme, Windows SPSS 12.0 programında Mann Whitney U, t test, chi square ve Kruskal-Wallis H yöntemleri kullanılarak yapıldı ve p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

Sonuç: Sonuç olarak, bizim bulgularımız HBV ile infekte hastalarda bazı antioksidan enzim aktivitelerinde düşme ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinde bir artış olduğunu, fakat bu değişikliklerin hastalardaki viral yük ile ilişkilendirilemeyeceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Hepatit B virus (HBV), viral yük, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to investigate the relationship between viral load and lipid peroxidation and antioxidant enzymes in patients with hepatitis B virus (HBV) infection.

Materials and Methods: We examined 50 patients (26 male, 24 female) with HBV infection who had serological and molecular markers of HBV infection, before any antiviral medication administration. The patients were also separated in to subgroups according to their viral load. Control group were consisted of 40 healthy individuals (20 male, 20 female) who had no HBV infection and antiviral therapy in their medical history. In all patient and control groups, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in erythrocytes and serum MDA levels were assayed.

Results: Mean SOD, GSH-Px, CAT and MDA levels were 1060.75 U/g Hb, 17.95 U/g Hb, 15.81 kU/g Hb and 0.91 nmol/ml respectively in HBV infected patients; and 1334.54 U/g Hb, 77.12 U/g Hb, 21.31 kU/g Hb, 0.20 nmol/ml in control group. Statistically significant decrease was detected in GSH-Px and CAT activities in HBV infected patients when compared with the control group. SOD activity was also decreased in the patient group, although not statistically significant. In addition, MDA levels of the HBV infected group was statistically significantly increased when compared to the control group. However, when the patient groups were divided according to the viral load, CAT, SOD and GSH-Px activities in erythrocytes and serum MDA levels did not reach any significance. Statistical analysis was performed with Mann Whitney U, t test, chi square and Kruskal-Wallis tests by using Windows SPSS 10.0 program. P values <0.05 were determined as statistically significant.

Conclusion: In conclusion, our data have demonstrated a significant decrease in some antioxidant enzyme levels and a significant increase in MDA levels, which are markers of lipid peroxidation, in HBV-infected patients, but no correlation between these differences and the viral load has been demonstrated.

Key Words: Hepatitis B virus (HBV), viral load, lipid peroxidation (LPO), antioxidant enzymes

GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROT) normal metabolizma süresince üretilen oksijen içeren moleküllerdir (1). Organizma sahip olduğu enzimatik ve non enzimatik antioksidan enzim sistemleri sayesinde endojen ROT'un zararlı etkilerinden korunabilmektedir. ROT başlıca süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerle uzaklaştırılmaktadır (2). Belirli koşullar altında, ROT ile antioksidanlar arasındaki hassas dengenin ROT lehine kayması sonucu oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır (3,4).

Hepatit B virusu (HBV), dünya üzerinde 350 milyon taşıyıcısı olduğu tahmin edilen, akut ve kronik hepatitin iyi bilinen bir etkenidir (5). HBV'una bağlı akut hepatitin ortalama %5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu olgularda da hepatosellüler kanser gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir. Kronik viral karaciğer enfeksiyonlarında karaciğer hasarının mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (6). Birçok çalışmada, kronik HBV ile ilişkili karaciğer hasarından ROT ve

LPO ürünlerinin sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (7,8). Bunun yanı sıra, HBV'lu hastaların klinik olarak değerlendirilmesinde oksidatif stresin göstergelerinin ölçümünün HBV belirteçlerine ek olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (7). HBV DNA, hepatitin biyokimyasal belirteçlerinden önce ve hastalık seyrinde değişik seviyelerde saptanabilir. HBV DNA'nın kantitasyonunun tespiti, HBV ile infekte hastalarda hastalık yönetimi ve antiviral tedavinin etkinliğinin takibinde önemli bir gösterge olarak değerlendirilmektedir (9). HBV enfeksiyonunda karaciğer hasarının akut alevlenmesinin başlangıcında viral yük artışı gözlenmiştir ve viral yükü karaciğer hastalığı patogenezi arasında ilişki olabileceği vurgulanmaktadır (9,10). Viral yükü hepatitin biyokimyasal belirteçleri arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma bulunmakla birlikte literatürde viral yük ile serbest radikal hasarının ilişkisini açıklayan az sayıda çalışma bulunmaktadır (11,12). Bu çalışmada farklı viral yüke sahip HBV gruplarında antioksidan enzimler ve LPO arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olguların seçimi

Çalışmaya laboratuvar bulgularına dayanarak HBV enfeksiyonu tanısı konmuş, antiviral tedavi almamış 26'sı erkek ve 24'ü kadın 50 kişi (yaş ortalaması 36.1 ± 12.3) hasta grubu olarak alındı. HBV enfeksiyonlu hastaların tanısı klinik bulguları göz ardı edilerek, HBsAg, total anti-HBc (AxSYM, Abbott Laboratories-USA) ve HBV DNA (1×10^3 - 1×10^9 doğrusallık alanında Roboscreen, Leipzig, Germany ticari kiti kullanılarak GeneAmp 7700 sequence detector system, Perkin Elmer cihazında real time polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanmıştır) pozitifliği dikkate alınarak konulmuştur. Hasta grubu, HBV DNA kopya sayısına göre 10^3 kopya/ml'den az olanlar altgrup1 (n=14), $1-9.9 \times 10^3$ kopya/ml olanlar altgrup2 (n=14), $1-9.9 \times 10^4$ kopya/ml olanlar altgrup3 (n=12) ve 10^5 kopya/ml ve üzeri olanlar altgrup4 (n=10) olmak üzere 4 alt gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu, HBV enfeksiyonu olmayan ve daha önce de geçirmemiş, klinik bulguları olmayan, antiviral tedavi almamış 20'si erkek ve 20'si kadın 40 (yaş ortalaması 35.3 ± 10.2) sağlıklı gönüllüden oluşturulmuştur.

Materyallerin hazırlanışı

Bireylerden antioksidan enzim aktivitelerini tayin için EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri, ilk olarak 30000 rpm' de 10 dk süreyle santrifüj edilip, üstteki plazma kısmı aspire edildi. Alttaki eritrosit kısmı, 3 kez soğuk %0.9 NaCl ile yıkandı. Her bir yıkama, 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlemenin ardından üst fazın atılmasıyla tamamlandı. Yıkama işleminden sonra 2 ml soğuk bidistile su ilavesiyle hemolizat hazırlandı. Serum malondialdehid (MDA) düzeyleri için bireylerden alınan venöz kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum ve hemolizatlar ölçümlere kadar -80°C 'da muhafaza edildi.

Ölçüm yöntemleri

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehid (MDA) ölçümü için Draper ve Hadley'in

çift ısıtma yöntemi kullanıldı (13). Metodun prensibi MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm de verdikleri absorbansın ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

SOD aktivitesi Woolliams ve ark. (14)'nin metoduna göre ölçüldü. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.

GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentina (15)'nin yöntemine göre ölçüldü. GSH-Px kümen hidroperoksit varlığında glutatyonun oksidasyonunu katalizler. Ortamda glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında ise okside glutatyon redükte glutatyonla dönüştürülürken NADPH'da NADP^+ 'ya dönüşür. NADPH'in 340 nm'deki absorbans düşüklüğü spektrofotometrik olarak ölçülür. SOD ve GSH-Px aktiviteleri U/g Hb cinsinden ifade edildi.

CAT aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışıldı (16). CAT hidrojen peroksidin (H_2O_2) su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler. Çalışmada CAT aktivitesi, H_2O_2 konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir. CAT tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edildi. CAT aktivitesi kU/gHb olarak verildi. Hemoglobin konsantrasyonu siyanomethemoglobin metoduyla hemolizattan tayin edildi (17).

İstatistiksel değerlendirme, Windows SPSS 10.0 programında Mann Whitney U, t test Chi-Square ve Kruskal-Wallis yöntemleri kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarında erkekler ve kadınların sayıları ve yaş ortalamaları arasında

Tablo 1. Kontrol ve HBV'lu hasta grubunda (alt gruplar dahil) SOD GSH-Px, CAT ve MDA değerleri (ortalama+standart sapma).

	SOD (U/g Hb)	GSH-PX (U/g Hb)	CAT (kU/gHb)	MDA (nmol/ml)
Kontrol grubu (n=40)	1334.54 + 273.90	77.12 + 24.23	21.31 + 7.22	0.20 + 0.06
Hasta grubu (n=50)	1060.75 + 641.01	17.95 + 6.90	15.81 + 8.24	0.91 + 0.20
Hasta altgrup1 (n=14)	1097.95 + 831.15	18.52 + 4.77	19.24 + 10.88	0.87 + 0.14
Hasta altgrup2 (n=14)	1014.07 + 572.12	15.95 + 2.86	16.86 + 8.35	0.92 + 0.14
Hasta altgrup3 (n=12)	1000.0 + 295.99	20.43 + 12.5	13.09 + 4.89	0.95 + 0.14
Hasta altgrup4 (n=10)	1146.97 + 800.41	16.97 + 2.83	12.77 + 5.33	0.89 + 0.17

Chi-Square ve Student t testlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol ve hasta gruplarında ölçülen eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri ile serum MDA düzeyine ait ortalama değerler Tablo 1'de gösterilmiştir.

HBV'lu hasta gruplarında kontrol grubuna göre GSH-Px ve CAT aktivitelerinde Student t testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmış ($p<0.05$, $t=14.9$ ve $t=3.3$), SOD aktivitesinde ise bir azalma gözlenmekle beraber bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$, $t=2.7$). MDA seviyelerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$, $t=30.3$).

HBV'lu hasta alt grupları arasında Kruskal-Wallis ve Mann Whitney U testlerine göre eritrosit SOD, GSH-Px, CAT aktiviteleri ve serum MDA seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$, $Z=0.3$ ve $Z=1.6$).

TARTIŞMA

Hepatik hasar ve fibrozisle sonuçlanan çeşitli karaciğer hastalıklarının patogenezinde serbest radikaller ve lipid peroksidleri giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Karaciğer fibrozisinin başlangıç ve ilerleyişine ROT ve LPO ürünlerinin katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (7). LPO'nun hepatosit zedelenmesinin ana nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. LPO ürünü olan MDA'nın kollagen gen ekspresyonunu ve üretimini artırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan bu ürün-

lerin Kupffer hücrelerini de aktive ettiği bilinmektedir. İzole perfüze karaciğer ve izole hepatositler üzerinde yapılan çeşitli araştırmalar serbest oksijen radikallerinin hücre fonksiyon ve bütünlükte bozulmaya neden olduğunu göstermiştir (18,19).

HBV enfeksiyonları sırasında oluşan karaciğer hücre hasarının kronikleşmesinin mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. İndirek bulgular oksidatif stres ve mitokondrial hasarın rol oynayabileceğini göstermektedir (7). HCV enfeksiyonunda olduğu gibi, ROT'un kronik HBV enfeksiyonunun ilerleyişinde ve hasarın ortaya çıkmasında rolleri vardır (20). Kaçmaz ve ark. (19), çalışmalarında, yüksek ALT ve AST değerlerine sahip HBV'lu grupta diğer gruplara göre daha yüksek MDA seviyeleri bildirilmiş ve yüksek ALT seviyeleri ile MDA arasında korelasyon olmadığı, yüksek AST seviyelerinde anlamlı bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Wang ve ark. (12) ise ALT ve MDA seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon bulurken, HBV DNA ile MDA seviyeleri arasında bir ilişki saptamamışlardır. Xie ve ark. (20), yaptıkları çalışmada kronik HBV'lu hastalarda viral yük ile ALT düzeyi arasında korelasyon olmadığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, Hepatik nekroinflamasyon ve fibrozisin derecesi ile viral yük arasında bir ilişki bulunamamıştır (21). Biz ise HBV'lu hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında serbest radikallerin artmış üretimini yansıtan serum MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit ettik. Ancak serum MDA

seviyeleri ile viral yük arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamadık.

Chrobat ve ark. (22), kronik hepatit B ve C'li çocuklarda istatistiksel olarak anlamlı GSH-Px aktivitesinde artma ve CAT ve SOD seviyelerinde azalma göstermişlerdir. Ayrıca kronik viral hepatitli çocuklarda antioksidan bariyer eksikliğinin mümkün olabileceğini önermektedirler. Bizim çalışmamızda da, HBV'lu hastalarda CAT, GSH-Px aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir, SOD aktivitesinde bir azalma gözlenmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, ROT ve LPO HBV enfeksiyonunun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Bizim bulgularımız, HBV enfeksiyonlu hastalarda CAT ve GSH-Px antioksidan enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma ile LPO'nun göstergesi olan MDA seviyelerinde anlamlı bir artışın olduğunu, ancak viral yük ile LPO ürünü olan MDA ve antioksidan enzim aktiviteleri arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. Çalışmamızda SOD aktivitesinde bir azalma gözlenmekle beraber bunun istatistiksel olarak anlamlı olmaması, HBV enfeksiyonlu hastalarda viral yük ile oksidatif stres arasındaki ilişki hakkında kesin fikir yürütmek için daha geniş serili alt gruplar ile çalışmalara gereksinim duyulduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
2. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-24.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. Oxford; Oxford Science Publications; 1999.
4. Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 675-705.
5. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *New Engl J Med* 1997; 2: 1733-45.
6. Waris G and Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci*. 2003; 28: 311-21.
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; 5: 95.
8. 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(51): 766-70.
9. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(6): 1436-7.
10. Ito H, Yoshioka K, Ukai K, Watanabe K, Yano M, Ishigami M, et al. The fluctuations of viral load and serum alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2004; 30 (1): 11-7.
11. Ko WS, Guo CH, Yeh MS, Lin LY, Hsu GS, Chen PC, Luo MC, Lin CY. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005; 11(30): 4697-702
12. Wang K, Wang B, Fan XP, Lin YJ, Shui WP. Oxidative stress in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2004; 18: 172-4.
13. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 421-31.
14. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, and 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. *Research in Veterinary Science* 1983; 34: 69-77.
15. Paglie DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
16. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
17. Van kampfen EJ, Zjilstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv Clin Chem* 1965; 8: 141-87
18. Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterology* 1994; 41: 343-8.
19. Kaçmaz B, Ögüş 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.
20. Xie Y, Zhao H, Dai WS, Xu DZ. HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2(3): 418-22.

Kaya S. ve ark.

21. Yuen MF, Ng IO, Fan ST, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, et al. Significance of HBV DNA levels in liver histology of HBeAg and Anti-HBe positive patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(10): 2 032-7.
22. 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.

Yazışma adresi:

Dr. Recep Sütçü
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta
Tel: 0.246 211 20 74 Faks: 0.246 237 16 51
E-posta: drsutcu@yahoo.com.tr
