

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT B'Lİ HASTALARDA ERİTROSİT VE LENFOSİT  
ANTIOKSİDAN ENZİMLER, NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ  
VE PLAZMA SİTOKİNLERİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

T 107686

AYSUN BAY KARABULUT  
BİYOKİMYA Anabilim Dalı

107686

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. ENGİN M. GÖZÜKARA

MALATYA  
2001

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
a-) Viroloji.....	3
b-) Seroloji.....	4
2.1. Hepatit B enfeksiyonu.....	5
2.1.1. Akut Hepatit B (AHBV).....	5
2.1.2. Kronik Hepatit B.....	7
2.1.3. HBV'nin Fizyopatolojisi Ve Doğal Hikayesi.....	7
2.1.4. İnterferonlar.....	9
2.1.5. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunun İnterferonla Tedavisi.....	10
2.2. Sitokinler.....	11
2.3. Reaktif Oksijen Türleri (Serbest Radikaller).....	19
2.3.1. Süperoksit Radikali ( $O_2^*$ ).....	21
2.3.2. Hidroksil Radikali.....	22
2.3.3. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ).....	23
2.3.4. Tekil (Singlet) Oksijen ( $^1O_2$ ).....	24
2.3.5. Nitrik Oksit (NO).....	26
2.3.5.1. Nitrik Oksit Sentetaz(NOS).....	28
2.3.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Organizmadaki Oksidatif Hasar Mekanizması.....	30
2.3.6.1. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri.....	31
2.3.6.2. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri.....	32
2.3.6.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Proteinler Üzerine Etkileri.....	32
2.3.6.4. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri.....	33
2.4. Antioksidan Etki Tipleri.....	34
2.4.1. Antioksidan Enzimler.....	36
2.4.1.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX).....	36
2.4.1.2. Glutasyon -S-Transferazlar (GST).....	38
2.4.1.3. Süperoksid Dismutaz (SOD).....	39
2.4.1.3. Katalaz (CAT).....	41
3. MATERYAL METOD.....	43
4. BULGULAR.....	53
5. TARTIŞMA.....	63
6. SUMMARY.....	75
7. ÖZET.....	77

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında, tüm koşullarda desteğini içtenlikle ve titizlikle gösteren, hoşgörüsü bilgisi ve sabrı ile çalışmalarında desteğini esirgemeyen, her türlü zorlukta bana destek olan, saygıdeğer danışman hocam; **Prof. Dr. Engin M. Gözükara**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın deneysel aşamasında katkıları bulunan Yrd. Doç. Dr. Çetin Öztürk'e, ayrıca bölümümüzdeki hocalarım Doç. Dr. Ömer Akyol' a, Doç. Dr. İsmail Temel' e, Doç. Dr. Yusuf Türköz'e, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Çıgılı'ya ve tüm asistan arkadaşlarıma ve biyokimya personeline teşekkür ederim.

Hastaların bana ulaşmasında destekleri olan eski İntaniye bölüm başkanı Doç Dr. Emine Sönmez'e ve Dr. Yaşar Bayındır'a teşekkür ederim.

Çalışmanın deneysel aşamasında, Fizyoloji A.D. başkanı Doç. Dr. Hanifi Emre'ye laboratuvarlarını kullanmama izin verdiği için ve diğer fizyoloji asistanları ve öğretim görevlilerine lenfositlerin sonifikasyonu aşamasında yardımları için teşekkür ederim.

Ayrıca verilerin istatistiksel aşamasında bana yardımcı olan Yrd.Doç Dr. Saim Yoloğluna teşekkür ederim.

## KISALTMALAR:

**CCl<sub>4</sub>** : Karbon tetra klorur

**AHBV**: Akut Hepatit B virus enfeksiyonu

**KHBV**:Kronik Hepatit B virus enfeksiyonu

**KHBVIFN**: Kronik Hepatit B virus enfeksiyonu olup IFN  $\alpha$  tedavisi alan grup

**HBV** : Hepatit B virusu

**IFN  $\alpha$** : İnterferon alfa

**RT-PCR**: Rivörz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**2'-5' OAS**: 2-5 oligo-adenilat sentetaz

**IL-1  $\beta$** : Interlökin-1-Beta

**IL-2R**: Interlökin-2-Reseptörü

**IL-6**: Interlökin 6

**IL-8**: Interlökin-8

**TNF- $\alpha$** : Tümör Necroz Faktör Alfa

**ROS**: Reaktif Oksijen Türleri

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Süper Oksit Anyon Radikali

**HO<sub>2</sub><sup>-</sup>** :Hidroperoksil Radikali

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Hidrojen Peroksit

**OH $\cdot$**  : Hidroksil Radikali

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Singlet Oksijen

**LOO $\cdot$**  : Peroksit Radikali

**NO $\cdot$**  : Nitrik Oksit

**NO<sub>2</sub>**: Nitrojen Dioksit

**NOS**: Nitrik Oksit Sentetaz

**eNOS**: Yapısal (Konstitüf) NOS

**iNOS**: Uyarılabilir (İnducible) NOS

**NADPH** :  $\beta$ -Nikotinamid adenin dinükletid 3'- fosfat

**PUFA**: Poliansature yağ asitleri

**MDA**: Malondialdehit

**GSH-Px**: Glutasyon peroksidaz

**SOD**: Superoksid Dismutaz

**CAT**: Katalaz

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Viral hepatitler A,B,C,D,E,G olarak gruplara ayrılmaktadır. Akut viral hepatitler virus tipi, miktarı ve bireyin immünesine göre değişir. Akut hepatitlerde karaciğerin rejenerasyonu için gerekli süre 6 ay olarak kabul edilir. Hasarı sınırlayıcı ve rejenerasyonu artırıcı özgün bir tedavi yoktur. Kronik hepatitlerde uzun süreli inflamasyon ve sonuçta kollajen sentezinin artması ile fibrozis oluşarak karaciğer sirozu ve yetersizliği oluşur. Artan kollejen sentezini oksidatif stres regüle eder (1). Lipid peroxid ürünleri hücre membranı yıkılımını artırarak oksidatif yıkılıma sebep olur. Farklı etiyojilere bağlı olarak (CCl<sub>4</sub> toksisitesi, parasetamol, etanol, galaktozamin viral hepatitler gibi sebeplerden) lipid preoksid ürünleri artmaktadır (2,4). Viral hepatitlerde özellikle lenfosit içi antioksidan düzeylerle ilgili çalışma oldukça sınırlı hatta yok denecek kadar azdır (3,5). Bu çalışma ile viral hepatitlerde o oksidatif stresin oluşturduğu hasarı; özellikle enfeksiyona karşı oluşmuş olan immunitiyi gösteren hücreler olan lenfositlerdeki aktivite ile interferon tedavisi alan kronik viral hepatitli hastalarda, lenfosit ve eritrosit antioksidan enzim kapasitesi araştırılmak amaçlanmıştır.

Hepatit B ve C enfeksiyonlarında sitokinlerin aktivitesinin değiştiği değişik çalışmalarda gözlenmiştir (7). Viral hepatitlerde oluşan karaciğer hücre hasarı, çoğunlukla virus ile enfekte hücrelerin neden olduğu immün yanıt ile ilişkilidir. Hepatit viruslarının, hepatositleri ve diğer bir çok hücreyi enfekte etmelerinden sonra viral proteinlere yönelik özgün immün yanıtlar gelişmektedir. B lenfositler tarafından birçok viral antijene karşı geliştirilen antikor yanıtı, viral enfeksiyonun önlenmesi ve virusların opsonizasyonunda rol oynamaktadır (8). Fakat, virusun yayılımının önlenmesi esas olarak CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfositler tarafından sağlanmaktadır. Kupffer hücreleri ve B lenfositler, major histokompability kompleks (MHC) class II molekülleri ile birlikte viral peptitleri CD4<sup>+</sup>T lenfositlere sunmaktadır. Bu hücrelerden salınan sitokinler ise, B lenfositleri ve CD8<sup>+</sup>T hücrelerinin aktivitesini düzenlemektedir (9,10). CD4<sup>+</sup>T hücreler, antiviral immün yanıtı başlatan hücrelerdir. Bu hücrelerden salınan sitokinlerin, hem virusun oluşturacağı hastalık tipini, hem de viral enfeksiyonun sonucunu belirlemede oldukça önemli oldukları düşünülmektedir (11,12). Virusla karşılaşma sonrasında CD4<sup>+</sup>T lenfositlerden ve diğer bir çok immün efektör hücrelerden TH<sub>1</sub> sitokinler; IL-2, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  üretildiğinde viral çoğalmanın etkin şekilde inhibe edileceği, TH<sub>2</sub> tip sitokinler (IL-4 IL-5, IL10) üretildiğinde ise, virusun konakçıda kalması kolaylaşabileceği ve hastalığın kronikleşeceği bildirilmiştir. Viral hepatitlerde TH<sub>1</sub> ve TH<sub>2</sub> sitokin kalıbının önemi ve bu iki uç sitokin yanıtın

enfeksiyon sonucunu ne yönde etkilediği konusunda yoğun çalışmalar devam etmektedir. Burada hepatit B'li ve interferon tedavisi uygulanan hastalarla; sitokinler ile eritrosit ve lenfosit içi antioksidan enzimler ile bu parametrelerin birbirleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizde (% 3.9-12.5) ve dünyada (orta endemisite gösteren bölgelerde %2-10) bu kadar yaygın olan ve akut hepatitin ortalama % 5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir kısmının siroza dönüştüğü, sirozlu olgularda da hepatosellüler kanser gelişmesi riskinin oldukça fazla olduğu bilinen bir gerçektir. Bu yüzden, HBV'de eritrosit içi ile beraber lenfosit içi antioksidan aktivitenin araştırıldığı kısıtlı denecek düzeyde çalışma olduğundan; hem tedavi hem de teşhis açısından, özellikle sitokinlerle kombine araştırmanın, gelecekte interferon tedavisinden başka, değişik antioksidan ajanların uygulanarak HBV'nin tedavi edilmesi açısından bu çalışmanın önemli olacağını düşünmekteyiz.



## 2.GENEL BİLGİLER:

Hepatit B virusu Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virusudur. Hepadna viruslar ailesinin içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek tür HBV'dur. Enfekte olan hücrelerde birden fazla sayıda partikül tipi ile diğer hayvan viruslarından büyüklük, yapı ve miktar yönünden birbirine benzemeyen üç tip partiküle sahip olmasıyla ayrılır. Bunlar :

- a) Yaklaşık 42 nm çapında, infektif özellikte, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli Dane partikülleri,
- b) Yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-infektif, küresel partiküller,
- c) Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit ihtiva etmeyen, non- infektif; tubuler partiküller.

Her üç formda infekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500µg/ml) saptanabilen ve HBsAg denen ortak yüzey antijenine sahip olup, immunojeniktir. Anti – HBs antikoları ile reaksiyon verirler. (13)

### a-) VİROLOJİ :

HBV, DNA viruslarından olup hepadna viruslar ailesinden insanları, ağaç kakan, sincap ve ördekleri infekte eden bir virustur. Bu virusların hepsi karaciğerde benzer replikasyon yaparak siroz ve hepatosellüler karsinoma oluştururlar.

HBV 'nin temel genleri şunlardır:

**S geni :** Yüzey veya zarf geni olarak bilinen HBsAg üreten bir genidir.

**C geni :** Core yani çekirdek geni olarak bilinir, HBcAg ve HBeAg üretir. HBeAg; HBcAg 'den kaynaklanan dolaşan bir viral peptiddir.

**P geni:** Viral replikasyonda görevli DNA polimeraz genidir. (Reverz Transkriptaz etkisi gösterir.)

**X geni:** Viral replikasyon için gerekli 2 transkripsiyon aktivatörünü kodlar. Bu da hepatosellüler karsinomayı indükler.

**Dane Partikülü:** 42 nm çaplı çevresinde HBsAg bulunan, nükleokapsid veya kor antijeni (HBcAg) ve viral DNA bulunan bir partiküldür.

Bireyin immun sistemi aracılığıyla HBV 'nin etkin temizliği; hepatosit yüzey membranına yerleşik HBcAg kaynaklı peptidlerin salınımı ile CD8<sup>+</sup> (sitotoksik T ) hücre cevabını başlatır. HBcAg'ye yakın olan HBeAg aktif HBV replikasyonu oluşan hemen hemen her bireyde bulunan viral bir peptiddir. Precore mutantları defektif pre-C geni nedeniyle HBeAg peptidleri üretemezler. Bunun sonucunda precore mutantlarında, dolaşan

HBeAg düzeyleri viral replikasyon devam etmesine rağmen tesbit edilemezken HBV DNA tesbit edilebilir. Precore mutantlar, daha ısrarlı karaciğer yangısı ve bazen akut karaciğer yetmezliğine yol açabilir. Bunun sonucunda; IFN  $\alpha$  tedavisine dayanıklılık ile karaciğer transplantasyonundan sonra fazla miktarda graft kaybına neden olabilir. Bu yüzden nadiren oluşan precore mutant'dan başka immün yanıtın hedefi olan ve HBcAg ile yakın ilişkisi olan HBeAg 'nin tesbiti immün toleransın varlığını tesbit etmede pahalı olmayan bir markırdır. Uzun süreli immünite HBsAg'ye karşı oluşan antikorlar (anti-HBsAg) yoluyla; ya doğal olarak virusla karşılaşma sonrasında veya rekombinant HBsAg aşısı ile sağlanır. Aşağıda HBV'nin serolojisi görülmektedir.

#### **b-) SEROLOJİ:**

HBsAg pozitif = HBV ile infeksiyonu gösterir.

Anti-HBs pozitif = HBV'ye bağışıklık kazanıldığını gösterir.

Anti-HBc pozitif = Hastanın yaşamında herhangi bir zamanda meydana gelmiş HBV'ye maruz kalmayı gösterir.

IgM Anti-HBc pozitif = HBV' ye geçen 3-6 ay arasında maruz kaldığını gösterir.

HBeAg pozitif (yüksek HBV-DNA) = Virus aktif; bütün vücut sıvıları ile potansiyel olarak diğerlerine bulaşır.

Anti-HBe pozitif (düşük HBV-DNA) = Virüs inaktif; sadece kan ile diğerlerine bulaştığı düşünülüyor.

HBV' nin bir çok viral antijenik grupları vardır. Bunlar:

**a** tipi HBsAg'li bütün bireylerde görülür. Diğerleri d, y, w, r 'dir ki bunlar a tipi ile kombine olarak (adw, ayw, adr, and, ayr) olmak üzere 4 temel HBV alt tipi vardır. Genel olarak bu alt tiplerin klinik önemleri Hepatit B immün globün (HBIG) profilaksisi ve transplantasyondan sonra HBV iyileşmesine neden olmalarından başka bir önemleri yoktur. Bu alt tipler epidemiyolojistlere; hastalığın kaynağını ve diğer ilişkili dokuları araştırmak açısından yardımcı olur. Nadiren iki veya daha fazla viral subtip bir bireyi infekte edebilir ki bu da nadir olgu olarak bilinen HBsAg ve antiHBsAg 'nin birlikte bulunduğu durumlarda görülür (14,15,16).



## 2.1. HEPATİT B ENFEKSİYONU

### 2.1.1. AKUT HEPATİT B (AHBV)

Hepatit B'nin diyagnozunda; sarılık öncesi dönemde ateş, kızarıklık, poliarteritis görülmesi, hastalığın hepatit B'ye doğru gittiğini gösterir (14). Bu hastalığın 40- 180 gün gibi uzun bir periyodu vardır. HBV 'nin en fazla görülen bulaşma şekli anneden doğumdan önce veya doğumdan sonra bulaşabildiği gibi sexüel yolla bulaşma da dünyada en çok görülen bulaşma sebepleri arasındadır. Amerikada , HBV 'nin kanla veya kan ürünleri (kan transfüzyonu yapılan hastalar ile hemofili ve onkoloji bölümündeki hastalardan) ile özellikle hastane personeline enjektörlerle, İ.V. ilaç bağımlılarında, sexüel yolla (özellikle homoseksüellerle ve hayat kadınları ) (17), tükürük ve diğer infeksiyöz atık ürünleri ile de bulaşma söz konusu olduğu rapor edilmiştir (18). Akut hepatit B için risk faktörleri tablo: 1 de özetlenmiştir.

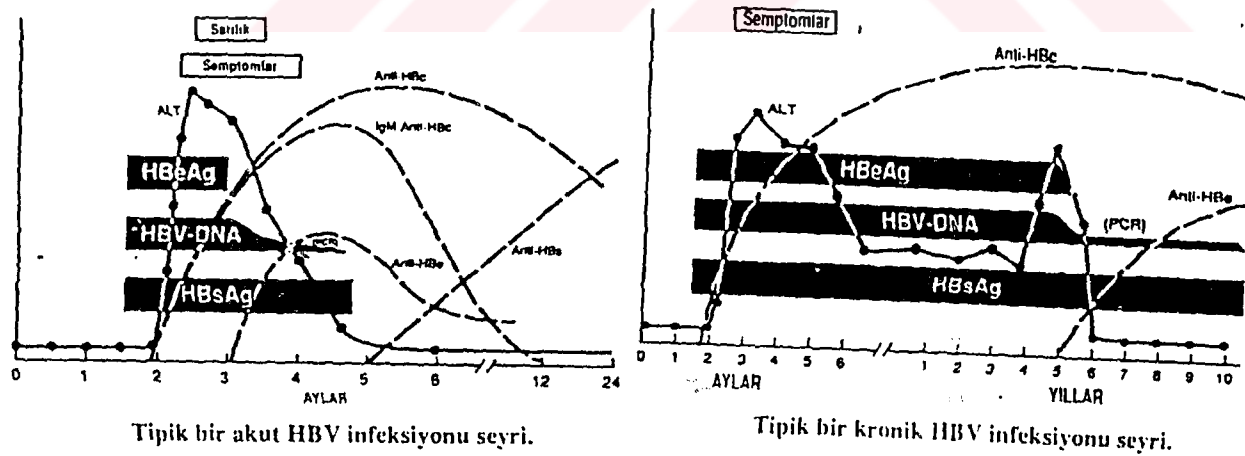
**Tablo 1: Akut Hepatit B Bulaşma Faktörleri**

Hepatiti B	Bulaşma Risk Faktörleri (%)
Heteroseksüel ilişki	41
İ. V. İlaç bağımlıları	15
Homoseksüel ilişki	9
Ev halkı	2
Sağlık Personeli	1
Diğer	1
Bilinmeyen	31

Yine Amerikada yapılan araştırmalarda heterosexüel aktivite (%41) ve İ:V. İlaç bağımlılarında (%15) en önemli sebepler arasında olduğu görülmüştür. Bu yüzden donörlerden alınan kanlar yüksek risk grubu olarak düşünülmeli ve plazmaları HBsAg yönünden ve anti HBc yönünden mutlaka test yapılmalıdır. Akut hepatit B'nin teşhisi HBsAg'nin serumda bulunması ile olur. HBsAg, semptomların başlamasından önce 2-7 hafta boyunca serumda bulunabilir. Genellikle ısrarlı olarak hastalık bitene kadar devam eder ve hastalık geçince kaybolur. Hastaların % 95 'inde semptomların ve hastalığın başlamasıyla birlikte HBsAg pozitif olur. Fakat bazı hastalarda HBsAg hızla temizlenir ve hastanın test sonuçlarında görülmeyebilir. Bu durumda teşhis için antikorların kullanılması uygun olur. HBsAg'ye karşı oluşan antikorlar (anti-HBs) hepatit B'den iyileşme süresinde ortaya çıkar

ve bazı durumlarda iyileşme döneminde tesbit edilemeyebilir. Hepatit B core antijenine karşı oluşan antikolar (anti HBc) HBV enfeksiyonu için daha güvenilir bir markıdır ve genellikle semptomların başladığı dönemde ortaya çıkar. Duyarlı ve spesifik immunoassay yöntemleri anti-HBs ve anti-HBc 'yi ölçmeye uygundur. Fakat AHB nin teşhisinde bunların hiçbiri yeterli değildir. Çünkü hem anti-HBs hem de anti-HBc uzun süre bulunabilir. Bu antikolar sadece akut hepatit B'de bulunmayabilir daha önceden HBV ile infekte olup daha sonradan başka bir virusla infekte olan bireylerde de görülebilir. Fakat IgM anti-HBc için geçerli immunoassay yöntemi ile HBV'nin teşhisi mümkündür. IgM anti-HBc, AHBV'nin ilk dönemlerinde ortaya çıkar ve çabucak azalır, sadece hastalıktan sonra 6-24 ay kalabilir (Şekil:1).

AHBV'li hastalarda aynı zamanda erken antijen (HBeAg) ile HBV teşhisi konabildiği gibi serumda HBV-DNA [moleküler hibridizasyonla veya Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA polimeraz ile de tesbit edilebilir. Aktif viral replikasyonun bu markırları akut hepatit'in erken dönemlerinde tesbit edilebilir. Klinik hastalık ve sarılığın pik yapmasıyla HBV 'nin serumdaki düzeyleri azalır veya yok olur. Gerçekten HBeAg'nin, HBeAg antikoruna (anti-HBeAg) dönüşmesiyle viral replikasyonun geçtiğini ve enfeksiyonun azalmakta olduğunu anlarız (14).



şekil:1 Akut ve Kronik hepatit B enfeksiyonun tanısı

% 5-10 HBV'li hasta HBsAg' yi temizleyemez bu durumda HBsAg taşıyıcısı olur. Bu hastalar hafif anikterik, asemptomatik olmakla beraber AHBV hikayesi oluşmadan kronik HBsAg taşıyıcısı olurlar. Semptomatik akut viral hepatit sonucunda kronik HBsAg taşıyıcılığı gelişmesi; asemptomatik hastalıktan kronik HBsAg taşıyıcılığı gelişmesinden daha az yaygın olarak meydana gelir. Akut infeksiyondan sonra HBeAg pozitifliği veya HBsAg pozitifliği 6 aydan daha uzun süre devam ederse kronik taşıyıcılık durumundan şüphelenilmelidir. Kronik HBsAg taşıyıcılığı durumu, akut viral hepatitin teşhisinde karmaşıklığa yol açabilir. HBsAg pozitifliği bulunan akut viral hepatitli bir hasta akut hepatit B olmayabilir ve bu hasta HBsAg taşıyıcısı veya başka bir akut karaciğer hastası olabilir. Kronik HBsAg taşıyıcılığı akut viral hepatitin diğer formlarına karşı özellikle Hepatit D virusuna karşı yüksek risk grubudur. Bu durumda IgM anti-HBc 'nin tesbiti yardımcı olabilir. Akut tip hepatit B'de eğer kronik HBsAg taşıyıcılığı var ise başka bir akut hepatosellüler hasar ile birlikte IgM anti-HBc bulunmaz (14).

### 2.1.2 KRONİK HEPATİT B

2000 yılına kadar 400 milyondan fazla, yani dünya popülasyonunun %5 'inde, kronik hepatit B (KHBV) infeksiyonu görülmüştür (14,15). HBV, kronik hepatitin, sirozun ve hepatosellüler karsinomun temel sebeplerinden biridir ve her yıl HBV kaynaklı 1 milyondan fazla insan ölümü söz konusudur. HBV infeksiyonunda interferon  $\alpha$  'nın kısıtlı faydası vardır. HBV aşuları güvenli ve etkili olmasına karşın hala herkes tarafından uygulanmamaktadır. Taiwan'da yapılan bir çalışmaya göre; HBV aşularının hepatosellüler karsinoma görülme sıklığını azalttığı rapor edilmiştir (19). ABD'de yeni doğanlarda ve yetişkinlerde aşılama programı standart hale gelmiştir (20).

### 2.1.3. HBV'NİN FİZYOPATOLOJİSİ VE DOĞAL HİKAYESİ:

HBV direkt sitopatik etkili bir virus değildir. Aksine bireyin immün yanıtıyla ilgili olduğu düşünülmekte ve akut hepatik hasarda ve uzun süreli HBV infeksiyonunda kronik hepatit ve sirozun da önemli rolü vardır. Aktif hepatik hasar da, virüsü temizlemek amacıyla oluşan hücre hasarı ve apoptosis olgusunun bir kısmıdır. HBV replikasyonunun süresi bireyin immün sisteminin yeterliliğine bağlıdır. HBV 'nin alınmasından sonra yenidoğanların % 95'den fazlası anneden infeksiyonu alarak kronik taşıyıcı olurken, erişkinlerin % 5'i taşıyıcı olur. Çocuklarda horizontal bulaşma infeksiyonun en önemli kaynağıdır. 6 yaştan küçük yeni doğan çocukların % 30'unda enfeksiyon alındıktan sonra kronik taşıyıcılık durumu söz konusu olur. Çocuklarda kronik HBV subklinik ve hafif seyirli

olmasına rağmen uzun süre devam ederse; siroz, karaciğer yetmezliği, hepatosellüler karsinomaya kadar gidebilir (14).

HBV'nin yaşam siklusu tablo:2 'de görüldüğü gibi 4 bölüme ayrılır (15). İlk 2 basamak replikatif fazdır ki bu fazda aktif viral replikasyon olur. 3. ve 4. basamak integratif fazdır ki bu fazda bireyin genomuna viral integrasyon olur. Her basamak; bireyin genetik durumundan, cinsiyetinden, yaşından, immun sistemin HBV enfeksiyonuna yanıtından, viral koinfeksiyondan, HBV mutantlarından ve diğer bazı önemli faktörlerden etkilenir. 1. basamak süresince HBV 'ye karşı bireyin immün toleransı, viral replikasyon süresince herhangi bir klinik belirti olmaksızın devam eder. Serum aminotransferazı normal kalır. Sağlıklı bireylerde inkubasyon periyodu olarak bilinen 2. basamak, 2 veya 4 hafta viral temizleme başlamadan önce devam eder. Yeni doğanlarda ise bu süre on yıllarca sürebilir. Fakat hepatik yangı azdır ve siroza dönüşüm nadirdir. 2. basamakta bireyin immün cevabı, hepatosit yüzeyinde bulunan HBV proteinlerine özellikle HBc Ag'ye karşı direkt olarak sitotoksik T lenfosit ( $CD8^+$ ) salınımını başlatabilir. 2. basamakta hepatik yangı uzun sürerse ve yoğun olursa bireyin hepatosellüler karsinomaya ve siroza karşı riski olur. Bir çok normal bireyde bu aşama 3-4 hafta sürerken kronik taşıyıcılarda 10 yıl veya daha fazla sürebilir. Hepatik yangı geliştiğinde 5 yıl içinde % 50 hastada siroz gelişmesine rağmen; % 71 hastada 5 yılda karaciğer yıkımı fazla olmazsa düzelme olabilir.

3. basamak viral replikasyon bireyin immun yanıtının düşmesiyle başlar. Serumda HBeAg temizlenir, HBeAg antikorları (anti-HBeAg) tesbit edilebilir düzeye gelir ve HBV-DNA aniden düşer. Böylece aktif HBV enfeksiyonu bitmiş olur. Fakat viral DNA miktarının az bir kısmı serumda hassas RT-PCR yöntemi ile tesbit edilebilir. İmmun yanıtın azalmasıyla, hepatik yangı düzelir ve serum amino transferazları normale döner. Uzayan periyotta hepatosit genomuna S geninin integre olması nedeniyle HBsAg tesbit edilebilir düzeyde kalabilir. 4. basamakta HBV'ye karşı serumda bireyin immun mekanizması ile HBsAg temizlenir ve anti-HBs tespit edilebilir. HBV-DNA karaciğerde bulunabilmesine rağmen RT-PCR ile bile tesbit edilemez. Nadiren; kemoterapi, organ transplantasyonu, HIV enfeksiyonu durumunda HBV yeniden aktive olur ve karaciğer yangısı yeniden oluşarak daha da hasar verici bir duruma geçebilir (21).

**Tablo 2: HBV'nin basamakları.**

Basamak	Replikatif Faz		İntegratif Faz	
	1	2	3	4
HbsAg	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif
HbsAg Antikoru	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
HbcAg Antikoru	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
HbeAg	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
HbeAg antikoru	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif
HBV DNA	Güçlü Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
AST ve ALT	Normal	Artmış	Normal	Normal

#### 2.1.4. İNTERFERONLAR:

İnterferonlar virus enfeksiyonlarına veya diğer uyarıcılara karşı hücrenin yanıt olarak sentezlediği düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. İnterferon virusun üremesini durdurur ve konak hücreye toksik etkisi yoktur. Bir virus ile enfekte hücrede, ikinci bir virusun çoğalamaması, yani viral interferans etkisi, ya birinci virusun ikinci virusun içine girmesini sağlayan reseptörleri bloke etmesi, ya replikatör sistemlerini tutmuş olması ya da inhibitör mekanizmayı başlatmış olması (interferon sentezi) ile mümkündür. Virüsle enfekte edilen hücrelerde interferon sentezlenir ve kolayca dışarı salınır. İnterferon yeni bir hücreye ulaşınca, hücrenin virüse karşı olan yapısını değiştirerek, hücre içine girmesini ve üremesini engeller (22).

İnterferon ailesi glikoprotein yapısında olup tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki tiptir. Tip 1 interferonlar (12 IFN  $\alpha$  subtipi, 1 IFN- $\beta$  subtipi ve 1 omega subtipi) viral enfeksiyon girdikten birkaç saat sonra salınır ve replikasyonu spesifik olmayan bir yolla inhibe eder. Tip 2 IFN (IFN  $\gamma$ ), antijenik olarak uyarılan immunositler tarafından salınır ve spesifik immun yanıtı aktive eder.

Tip 1 interferonlar hücre yüzey reseptörüne bağlanarak hücresel genlerin büyük bir kısmının transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlarlar. İnterferonların büyük kısmının indüklediği proteinlerin fonksiyonu bilinmemesine rağmen bazılarının antiviral aktiviteleri çok iyi bilinmektedir.

IFN  $\alpha$ 'nın stimülasyonundan sonra 2'-5' oligo-adenilat sentetaz (2'-5' OAS) enzimini üretir. Çift sarmallı RNA varlığında 2-5 OAS aktive edilir ve aktive edilen enzim 2' ve 5' fosfat esterlerinde (5' ve 3' fosfatlara bağlı nükleotitleri içeren DNA ) ATP içeren oligonükleotitleri sentezler. 2-5 OAS tarafından aktive edilen 2'-5' oligonükleotitler sentezlenerek çift sarmallı RNA'nın temizlenmesini sağlayan RNaz'ı aktive eder. Bu yüzden 2'-5' OAS çift sarmallı RNA'nın yıkılımını aktive eder. Teorik olarak 2-5' OAS çift sarmallı RNA'nın enfekte ettiği hücrelerde aktive edilebilir gibi görünse de hücre kültürü sistemlerinde sadece DNA içeren virüsleri de kapsayan farklı virüsler tarafından da aktive edilebilirler (23,24).

### 2.1.5. KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONUNUN İNTERFERONLA TEDAVİSİ

Kronik HBV enfeksiyonunun tedavi edilmediği takdirde uzun süre devam etmesi durumunda siroz, karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinoma gelişmesi durumu görülebilir (25). Tedaviye cevap verme olasılığında; coğrafik, genetik predispozisyon ve viral enfeksiyonun dönemi rol oynar. HBV enfeksiyonunun ikinci basamağı daha önceden de değinildiği gibi uzun sürer ve hepatik yangı oluşabilme ve tedaviye cevabın zayıf olması ihtimali düşünülerek erken dönemde yoğun tedaviye başlanmalıdır. Fakat birçok kronik HBV'li bireyde (özellikle vertikal bulaşmanın olduğu) birinci basamakta yani immun tolerans basamağında immunositumulator ajan olan IFN  $\alpha$ 'nın genellikle etkisi yoktur. Viral replikasyonu inhibe eden lavimudine gibi antiviral ajanlar uygun olabilir. Diğer taraftan bazı kronik taşıyıcılarda viral replikasyonun azaldığı; ikinci basamaktan üçüncü basamağa geçiş aşamasında antiviral ajanların veya IFN  $\alpha$ 'nın etkisi sınırlı olur. Dördüncü basamaktaki hastalar HBV'ye karşı bağışık olunan aşama olduğundan tedaviye gerek duyulmaz.

Son zamanlara kadar FDA'nın (Food and Drug Administration) onayladığı tek tedavi IFN  $\alpha$  idi. IFN  $\alpha$  ilk defa 1970'li yıllarda KHBV enfeksiyonunda kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda IFN  $\alpha$ 'nın miktarı rekombinant teknoloji ile artırılarak hem kronik HBV taşıyıcılarında HBsAg nin temizlenmesinde, hem de HBeAg'nin temizlenmesinde etkili olduğu çalışmalarla desteklenmiştir. Karaciğer histolojisinde düzelmeler olduğu rapor edilmiştir.

HBV'li hastalar IFN  $\alpha$ 'ya her zaman yanıt vermeyebilir, özellikle doğum ve çocukluk döneminde virus alındıysa veya hafif artmış serum aminotransferaz düzeyi bulunan hastalarda gözlenir. Fakat yine de IFN  $\alpha$ 'nın etkileri HBV-DNA'nın azalması, HbeAg' nin azalması ve özellikle ALT düzeylerini normale dönmesi yapılan çalışmalarla gözlenmiştir. IFN  $\alpha$ ; hepatik yangının çözülmesi ile siroz ve hepatosellüler karsinoma riskini

önemli oranda azaltır. HBV 'nin bir kere temizlenmesinden sonra immunosupressör etkenler (örneğin; sistemik kemoterapi, HIV veya organ transplantasyonu gibi) olmadığı sürece aktif viral replikasyon çok nadir olarak tekrarlanır (14).

**Tedavi için Endikasyonlar:** İki durumda olur: 1.) En az 6 ay arayla HBsAg pozitif veya HBsAg pozitif ve IgM Anti-HBc negatif, HBeAg pozitif 3.) Geçen 3 ay içinde, ALT veya AST'nin normalden 1,5 kat daha fazla stabil yükselmeleri durumunda olur.

**Doz, Süre, İzleme;** Doz:Her gün subkutan olarak 4,5-5 milyon ünite veya haftada üç kez subkutan olarak 9-10 milyon ünite rekombinant interferon alfa uygulanabilir. Süre: Tedaviye toplam 4 veya 6 ay boyunca devam edilir. İzleme: Kontrol muayenelerinin tedavinin birinci, ikinci haftasından ve birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü ayından sonra yapılması önerilir.

İnterferon tedavisinin başlangıcına ve sonuna doğru, hasta, hepatit belirtilerinin tekrarlaması (yorgunluk, iştah kaybı, abdominal rahatsızlık, vs.) sonucu kendini daha kötü hissedebilir. Son zamanlarda kötüleşme, çoğu kez interferonun başarılı olduğunun bir işareti iken, ilk zamanlarda kötüleşme ilacın bir yan etkisinin yansıması olabilir.

## 2.2.SİTOKİNLER:

Sitokinler hücreler tarafından intrasellüler haberleşmeyi ve hücre içerisinde uygun ortamı sağlarlar. Bu moleküller immun yanıt, inflamasyon, hematopoezis, yara iyileşmesi ve yaralanmaya sistemik cevapta önemli rolleri olan hücreler tarafından üretilirler. Sitokinlerin karaciğerde hücreler arasında ilişkiyi sağlamak gibi birçok rolleri vardır. En önemli rolleri direkt olarak, viral replikasyonun inhibisyonu yoluyla, indirekt olarak bireyin viral enfeksiyona karşı immun yanıtını arttırarak viral enfeksiyona karşı koruma sağlarlar. Fakat virusa karşı oluşturulan inflamatuvar cevapta sitokinlerin salınımıyla, karaciğer yangısına da neden olabilirler. Sitokinlerin rollerini anlamada viral hepatit etkenlerine karşı sitokinlerin bu ikili zıt rolü; hem viral enfeksiyondan korunmada ve iyileşmede hem de karaciğer hasarı ajanları olarak düşünüldüğünde anlaşılabilir (24).

Viral enfeksiyondan hemen sonra antijen nonspesifik efektörler olan interferonlar salınmaya başlayarak virusa karşı koruyucu bir mekanizma geliştirirler. Tip 1 IFN'ler antiproliferatif ve antiviral etki yaparken, Tip 2 interferonlar immuno modulatör sitokinler olarak etki yaparlar (24).

Virus vücuda girdikten sonra hücresel immun yanıt, viral enfeksiyonu önlemek için ortaya çıkar. Hem CD8<sup>+</sup> hem de CD4<sup>+</sup>T hücreleri, viral protein ve HLA class I veya II molekülleri ile T hücre reseptörlerinin ilişkisiyle oluşur. CD4<sup>+</sup> hücreleri sitokin üretme kapasiteleri ile immün yanıtın kontrolünde önemli bir role sahiptirler. CD4<sup>+</sup> hücreleri tip 1

ve tip 2 yanıtı oluşturarak enfeksiyona karşı koruma sağlarlar (26). Prekürsör hücreler tip 0 olarak adlandırılan IL-4 ve IFN  $\gamma$  üretirler. Daha sonra tip 1 cevabını IL-2 ve IFN  $\gamma$  üretmek üzere oluştururlar. Bu cevap antijen spesifik hücrel immüniteyi ve virusa karşı hücre içi önemli koruma mekanizmasını oluştururlar. Tip 2 cevabı ise IL-4, IL-5 ve IL-10 dur. Ve bu yanıt humoral immün yanıt ve helmantik enfeksiyona karşı koruma sağlar. Tip 1 ve tip 2 yanıtı birbirlerini inhibe eder (24). İmmüno-regulator sitokinler viral enfeksiyonun temizlenmesinde ( $CD4^+$ ) T helper hücre aktivasyonunda önemli rol oynarlar. Akut HCV enfeksiyonlu olup iyileşme görülen hastalarda Th 1 (hücre aracılıklı) yüksek iken Th 2 (humoral) yanıt yok denecek kadar az veya hiç görülmemiştir. Karaciğer hasarının derecesine göre Th1 sitokinler olan IL-2 ve IFN  $\gamma$  'da artma olduğu gözlenmiştir. Immunomodulator tedavi olan IFN- $\alpha$  tedavisi Th-2 sitokinlerden olan IL-10 seviyesini azalttığı yönde çalışmalar vardır. IFN- $\alpha$ , Th2 immün yanıtı inhibe ederek Th1 yanıtını artırıp HBV enfeksiyonunun temizlenmesine katkıda bulunur. Fakat ne yazık ki bütün IFN- $\alpha$  kullananlarda artmış Th1 cevabını örnek mümkün değildir. Bunun sebebi de demir ve demir bağlayan proteinlerin aktivitesine (çok açık olmasa da) bağlanmıştır (14).

### **2.2.1.SİTOKİNLERİN KLİNİK ÖNEMİ:**

**2.2.1.2. Sitokinler ve inflamasyon:** İmmüno-inflamatuvar sistem, hücrelerin kompleks bir sistemidir ve sitokinlerin çoğunu da içine alan humoral elemanlardan oluşur. İmmüno-inflamatuvar cevap tipik olarak antijen tarafından tetiklenir. Antijen, antijen sunucu hücreler (APC) olarak isimlendirilen özelleşmiş hücreler tarafından sunulur. Bu hücreler major histokompatibilite kompleksin (MHC) ya klas I ya da klas II hücreler üzerinden antijeni sunarlar. Klas I sunumunda antijen molekülleri  $CD8^+$ T lenfositlerine sunulur. Klas II sunumunda antijen molekülleri  $CD4^+$  T – lenfositlerine (T–Helper) sunulur. Ayrıca antijen molekülleri B – lenfositlere ( $CD19$ ) veya sonuçta sitotoksik ve sitolitik cevap olmak üzere direkt olarak Tve B lenfositlere sunulabilir.  $CD4^+$  T lenfositler 2 alt tipe ayrılır. (Th1 ve Th2)

**Th2 (Thepeler 2) :** B lenfositlerin plazma hücrelerine çevrilerek antikor üretimine yol açan yardımcı (helper)  $CD4^+$  hücreleridir (27).

**Th1 (Thepeler 1) :** Hem B lenfositlerin supressörü hemde sitotoksik kabiliyeti olan  $CD8^+$  hücrelerinin gelişimine benzer bir sitotoksik ve sitolitik süreçten sorumlu tutulan lenfositlerdir. Böylece bunlar ya sitotoksikite veya antikor üretimine yol açan hücrel polarizasyonda esansiyel bir role sahiptir. Th1 ve Th2 hücrelerinin farklılaşması ise lokal çevresindeki sitokinlerin varlığına bağlıdır.  $CD4$  T lenfositlerin bu şekilde Th1 veya Th2 alt tiplerine transformasyonu immün yanıtta önemli bir basamaktır. Henüz kesinleşmemiş



olmakla birlikte Th 0 lenfositlerin Th1 veya Th2 hücrelerine polarize olması çevresindeki sitokinlerin varlığına bağımlı olduğu rapor edilmiştir. Örneğin; IFN- $\gamma$  ve IL-12'den zengin bir çevrede Th1 polarizasyonu olur. Fakat IL-4 ve hatta IL-13 'ten zengin ortamda ise Th 2 polarizasyonu olur. Sitokin ortamının tipi çevresindeki diğer transformasyonu inhibe eder (örneğin; IL-4 Th1 transformasyonunu, IFN- $\gamma$  Th2 transformasyonunu bloke eder)(27,14).

### 2.2.1.3 Sitokinler ve Kanser :

Sitokinlerin kanser biyolojisinde önemli bir rolü olduğu ilk kez 1893 yılında William Coley tarafından ortaya atılmış ve o tarihten itibaren gittikçe artan bir ilgi alanı olmuştur. Bu bilim adamı bazı malign tümörlerin bazı bakteriyel enfeksiyonlardan sonra gerilediğini göstermiştir. 1970'lerde sitokin devrimi denilebilecek gelişmeler olmuş ve bu tümör supressör özellik, interferonlar ve TNF'ler gibi tümör inhibitör sitokinlerin bakteriyel endotoksin salınımını artırmasına bağlanmıştır. Sitokinlerin malign süreçte birkaç yolla görev yaptığı bilinmektedir.

Kanserler çok heterojen bir hastalık grubudur. Malign transformasyonun oluşması ve devam etmesinin mekanizması değişik tümörlerde farklıdır. Fakat ortak olan mekanizma, normal hücre sel büyüme ve replikasyona ait olan ve bir kısmı intrasellüler sinyal mekanizmaları ile yürütülen sistemin hasara uğramasıdır. Çoğu durumda sitokinler ya bu kontrol mekanizmalarının bir kısmını oluşturular veya bu fonksiyonları görece diğer moleküllerin sentezini indüklerler. Örneğin bazı protoonkogenler ve onkogenler, sitokin reseptörünün normal veya anormal komponentlerini veya sinyal iletim yollarını kodlarlar.

Sitokinler, kanser hücrelerini hedef alan büyüme inhibe edici özelliklere sahip olabilirler ve böylece konakçı ve tümör ilişkisini modifiye ederek veya antitümör etkileri artırarak tümörü geriletirler. Sitokinler aynı zamanda malign hücreler için büyüme faktörleri olarak fonksiyon görebilirler. Böylece sitokinlerin aktivitesini inhibe etmek için terapötik stratejiler mümkün olabilir. Sitokinler ayrıca paraneoplastik etkilere aracılık edebilirler.

Klinik laboratuvarların ilgi sahasına girdikten sonra sitokinlerin biyolojik sıvılarda ölçümü, bazı tümörlerin ilerleyişini moniterize etmede ve eğer antikanser ajanları olarak kullanılır ise tedaviye yanıtın izlenmesinde önemlidir (27).

### 2.2.1.4 Büyüme ve Farklaşmanın Regülasyonu:

Sitokinlerin birçok hücre üzerine büyüme inhibe edici özellikleri (tümör modifiye edici sitokin)'nin araştırılmasında IFN'lerin büyük öneme sahip olduğu varsayılmaktadır. Sitokinler 'myc' gibi hücre sel protoonkogenlerin ekspresyonunun, DNA replikasyonu ile ilgili enzimlerin ve EGF gibi büyüme faktörlerinin reseptörlerinin down-regulasyonunu yapabilir.

Bunlar ayrıca *in vivo* olarak sitotoksik T hücrelerini aktive edebilirler. *Interferon α* (IFN-α) bir çok klinik amaçla kullanılmaktadır. U.S. Food and Drug Administration'dan hairy cell leukemia (HCL), myeloid lösemiler ve solid tümörlerin bir kısmında kullanılmak üzere izin alınmıştır. Bunlardan sadece HCL için tedaviye cevap oranı % 90 civarındadır. Bu oran geleneksel kemoterapiye göre çok üstün bir başarıdır. Bununla beraber diğer kanserler için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahiyi içeren çok yönlü bir tedavinin bir parçası olarak IFN- α'nın kullanılması mantıklı görünmektedir (27).

IL-6; meme ve over malign tümörleri ile miyeloid hücrelerden köken almış insan hücre dizilerinin bir çoğunun büyümesini inhibe eder. Ayrıca birkaç mürine tümörünün transplante edildiği farelerde tümör hacminin küçültülmesinde önemli bir etkiye sahiptir. Eğer hayvanlar immun yetmezlikli hale getirilirse bu tümör küçültücü etki ortadan kaybolmaktadır. Bunlara zıt olarak IL-6 plazmasitoma ve myeloma hücreleri için potansiyel bir büyüme faktörüdür. Hastalardan taze olarak elde edilen myeloma hücrelerinin kültürde IL-6 ürettiği gösterilmiştir. En son veriler yalnızca myeloma hücrelerinden kaynaklanan değil aynı zamanda kemik iliğine bitişik stromal hücrelerden köken alan myelomada da IL-6 üretilmesi bunun parakirin bir rolü olabileceğini göstermektedir. IL-6 'ya karşı gösterilmiş monoklonal antikorların erken dönemde tümör büyümesini geciktirici bir etkisinin olması sonucu ilginin bu yöne kaymasına neden olmuştur (27).

#### **2.2.1.5. Tümör Hücrelerine Toksik Etki:**

TNF'ler direkt sitotoksik etki ile proliferasyonu inhibe ederek ve değişikliği indükleyerek tümör hücre büyümesini inhibe edebilir. Mekanizmalar araziidonik asit bağımlıdır ve asıl neden tümör hücre DNA'sının yıkılmasıyla serbest oksijen radikallerinin bolca üretilmesi olabilir. Murine modellerinde bu moleküllerin kuvvetli antitümör aktiviteleri; büyümenin direkt inhibisyonu, immünomodulasyon ve vasküler sisteme olan etkileridir. Ne yazık ki, insan malignensilerinde yapılan çok geniş denemeler ümit kırıcı olmuştur. Bunun sebebini de TNF'lerin sistemik olarak verilmesi durumunda doz ile orantılı bir toksisite olduğundan bu doz hiçbir zaman yakalanamamaktadır. Bununla beraber izole ekstremite perfüzyonu ve intratümör enjeksiyonlar faydalı olmaktadır. TNF ayrıca bazı malign hücrelerin büyümesini stimüle edebilmektedir (27).

#### **2.2.1.6 Tümöre immün Yanıt:**

Sitokinlerin tümör suprese edici rollerinin bir kısmı, immün sistem üzerine olan bir çok regule edici etkilerinden kaynaklanmaktadır. IFN'ler birbirinden farklı bir çok normal ve malign hücre tipine MHC klas I antijenlerin artırarak etki eder. Sonuçta bu hücreler sitotoksik T hücreleri tarafından öldürülmeye daha yatkın olurlar. IL-2, tümör hücrelerine

çok daha sitotoksik etkiye sahip periferik kan lenfositlerinin subpopulasyonunu stimüle eder. Bu hücre subpopulasyonuna lenfokin-aktive edilmiş (lenfokin tarafından aktive edilen) öldürücü (LAK) hücreler denmektedir. Muhtemelen Naturel Killer (NK) hücre populasyonunun bir parçasını oluşturmaktadır. Bunlar hücrelere karşı immün yanıtta sorumludur. IL-2 intravenöz veya subkutan olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Renal hücre karsinoması ve melanoma da kemoterapiden daha iyi cevap vermektedir. Önemli toksik etkileri olduğundan IL-2'nin dozu sınırlı tutulmak zorundadır.

IL-2'nin hayvan çalışmalarında potent bir anti-tümör ve antimetastatik etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerini Th1 hücrelerini stimüle ederek ve IFN- $\gamma$  üretimini hızlandırarak yapmaktadır (27).

#### **2.2.1.7. Paraneoplastik Etkilerin Yönlendirilmesi:**

Bir çok paraneoplastik etkinin sitokinler tarafından yönlendirildiği bulunmuştur. IL-6, IL-1 ve TNF gibi sitokinlerin tipik olarak salgılandığı, lenfoid malignansilerde kanser ile bu sitokinler arasında birliktelik gözlenmiştir. Anemiler TNF ile, trombositoz IL-6 ile ve kaşeksi TNF ve IFN- $\gamma$  aracılığıyla oluşturulmaktadır. Kemik rezorpsiyonu ve hiperkalsemi IL-1 tarafından indüklenmektedir (27).

#### **2.2.1.8. Tümör Markırları Olarak Sitokinler:**

Sitokinler klasik tümör markırı kriterlerine uymamaktadırlar. Çünkü bunlar vücudun normal dokuları tarafından üretilirler. Nadiren tümörün kendisi tarafından üretilirler. Genellikle tümör etrafındaki dokuların cevabı olarak ortaya çıkarlar. Bunlara rağmen, bir çok durumda bunların ölçümü prognoz ve tedaviye cevapta klinik olarak önemli bilgiler vermektedir.

Serum IL-6 ölçümleri myelomanın prognozunda ve monoklonal gammopatilerden (MGUs) myelomanın ayırt edilmesinde büyük öneme sahiptir. Myelomalı hastaların büyük bir kısmında IL-6 seviyeleri artmıştır. Ve bu artış hastalık aktivitesi, proliferasyon indeksi ve canlılık ile orantılıdır. Büyük MGUS'lu hastalar normal veya düşük IL-6 seviyelerine sahiptir. Fakat ne yazıkki bu önemli bulguların ayırt edilmesinde klinik olarak faydalı bir markır olamamaktadır. IL-6 Hodgkin hastalığı ve non-hodgkin lenfomada, IL-6 seviyesi ateş ve malaise (B-semptomları) arasında bir korelasyon vardır. Ayrıca IL-6 seviyesinin artması daha kötü bir prognozun göstergesidir.

Renal kanser, kolorektal kanser ve melanomada yapılan çalışmalarda, CRP veya IL-6 seviyelerinin, IL-2 tedavisine cevap ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, başlangıçta bunların seviyesi düşüktür ve tedavi sırasında oldukça artmaktadır. Solubl (s) IL-2 reseptörlerinin konsantrasyonları bir kısım malignansilerde özellikle lenfoid sistemin malignansileri özellikle

lösemilerde oldukça artmaktadır. Bunun aynı zamanda yetişkin HCL ve T hücre lösemisinde de doğrulanması sIL-2R ölçümlerinin kullanılmasının hematolojik malignensilerin takibinde yeri olacağını gösterir.

TNF ekspresyonu veya protein üretimi bir çok hücre kültüründe ve biyopsilerinde gösterilmiştir. Örneğin; over ve meme kanserlerinde TNF mRNA veya protein tümörlerin % 50 ile %70 'ind bulunmuştur. Serum TNF ve sTNF R seviyeleri büyük bir malignensi grubunda artmış bulunmuştur. Ve bunların ölçümleri kanser takibinde faydalı olabilir (27).

**2.2.2. INTERLÖKİN 1: (IL1)** Hepatosit stimülatör faktör, B lenfosit aktivatör faktör, timosit aktivatör faktör, fibroblast aktivatör faktör, hemopoetin 1, lökosit endojen mediatör, lenfosit aktivatör faktör, mononükleer hücre faktörü, osteoklast aktivatör faktör, proteolitik uyarıcı faktör, serum Amiloid A uyarıcısı faktörü gibi adlar alır. IL-1'in temel kaynağı mononükleer fagositlerdir. IL-1 'in  $\alpha$  ve  $\beta$  subüniti vardır (27).

IL-1 in diğer önemli kaynakları 1. klasik antijen sunucu hücreler (monosit ve makrofajların yanı sıra langerhans hücreleri ,dentritik hücreler , B- lenfosit ve diğerleri) 2. endotel hücreleri, 3. T-hücreler , 4. NK hücreler , 5. Astrositler ,6. keratinositlerdir (28).

#### **IL-1'in Klinik önemi:**

IL-1 romatoid artrit , septik şok, periodontitis ,malignite, aspestos ,tüberküloz ve insan HIV enfeksiyonunun patogenezinin sorumlu tutulmaktadır. Bu IL-1'in varlığı hastalık aktivitesi ile korelasyon gösterir ve ayrıca tanıda önemlidir (gingival sıvı, serum veya sinovial sıvı ). Örnek, nonallerjik bronşial astmalı hastalarda önemli bulgulardan bir tanesi monositlerce üretilmiş IL-1 $\beta$  ve IL-6 seviyelerinin oldukça yükselmesi söz konusudur (29).

**2.2.3. INTERLÖKİN-2 : (IL-2)** T hücre büyüme faktörü olarak da bilinir (27).

Hücrel orjini, Aktive olmuş Th hücreleri özellikle CD4 T hücreleri (Th0- Th1), ve daha az oranda CD8 lenfositler Naturel Killer (NK) hücreleri tarafında IL-2 sentezi yapılır. Ayrıca B lenfosit ve mast hücreleri de IL-2 üretebilir (30).

**Solubl IL-2 reseptörü (sIL-2R)** Solubl sitokin reseptörlerinin tesbiti immünoinflamatuvar cevabın karakterizasyonunda önemlidir. KronikT- hücre stümlasyonu IL-2R- $\alpha$ 'nın uyarılmasına yol açar. Solubl reseptör zincirleri serbest IL - 2' ye bağlanarak bunun hücre reseptörleri üzerine olan etkisini bloke edebilir . Bununla beraber IL-2R -  $\alpha$ ,  $\beta$ , ve  $\gamma$  olması bunların immünosüpresyona önemli bir katkısının olmadığını gösterir .

Klinik olarak serum gibi biyolojik sıvılarda sIL-2R'nin miktarının artması sıklıkla kuvvetli bir antijenik reaksiyondan sonra oluşan kuvvetli bir immun cevap ile birlikte görülür (27).

**Klinik Önemi** : IL-2'nin artması; gebelik, multiple scleröz, sarcoidoz, multiple myeloma, akut romatizmal ateş ve kronik romatizmal kalp hastalığında görülür. Yaşlılıkta, diabette, romatoid artiritte, sjögren sendromunda, AIDS 'te IL-2 üretimi azalmıştır. Ayrıca son bulgular, HIV pozitif asemptomatik hastalardaki lenfositik alveolitisin, IL-2'ye bağımlı olarak CD8 sitotoksik T hücrelerinin in situ proliferasyonu sonucu olduğunu göstermiştir. Bazı hematolojik malignensilerde (hodgkin ve nohodkin lenfoma ) sIL-2R ve IL-2 seviyeleri düşük bulunmuştur (30).

**2.2.4 İNTERLÖKİN-6 (IL-6):** Önceleri 26-kDa protein, sitotoksik T hücre farklılaştırıcı faktör, hibridoma/plazmasitoma büyüme faktörü, monosit granulosit indüleyici tip 2 ve trombopoetin olarak bilinirdi (27,28,30).

**Hücresel orijini:** T ve B lenfositler, monositler/makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri, astrositler, mikrogialar, mezenşimal hücreler, osteoblastlar, epidermal langerhans hücreleri, dendritik hücreler ve keratonositler gibi geniş bir hücre topluluğu tarafından salınırlar.

**Biyolojik etkileri:** B lenfositler, hepatositler, T-lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve endotel hücreleri üzerine etkileri vardır. Ayrıca kemotaksis, immunoinflamatuvar reaksiyonda, ateş, nöroendokrin sistem üzerine etkisi vardır (27).

**Klinik Önemi:** Gram negatif bakteri enfeksiyonu ve inflamatuvar reaksiyonları takiben IL-6 seviyesi dolaşımda artar Sepsisli hastaların serumunda da IL-6 tesbit edilmiştir. Son çalışmalar, IL-6'nın viral enfeksiyona karşı koruma sağladığı ve bunu da nötrofiller üzerinden yaptığını göstermiştir. Bu durumda en kolay ölçülebilecek sitokinlerden biri IL-6'dır. Yüksek ve düşük seviyelerdeki yüksek dansiteli lipoproteinleri bulunan hastalarda tam kanda, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$ ) lipopolisakkarit duyarlılığı farklıdır. Bu da inflamasyon ve aterogenesisdeki önemini göstermektedir.

IL-6 bir çok hücre için otokrin bir büyüme faktörü olduğundan bunun fazla üretimi; plazmasitoma, multiple miyeloma, uterus servikal karsinoması, Kaposi sarkoma gibi bir çok malignensiye neden olur.

Cerrahi girişimler, tümör gelişimi, otoimmün hastalıklar, infeksiyöz hastalıklar, lokal ve sistemik hastalıkların patogenezinde ve deri dokusuna da yayılımı içeren bir çok hastalıkta rolü vardır (27).

**2.2.5 İNTERLÖKİN-8 (IL-8)** Kemokinler olarak da adlandırılırlar. Yangı ve lökosit göçünde önemli rolleri vardır. Hücresel kaynağı; monosit/makrofajlar, lenfositler, epitel hücreleri, fibroblastlar gibi bir çok hücredir(27). IL-8, IL-1 veya TNF  $\alpha$  'ya yanıt olarak ve

mitojenler, lektinler ve virusların etkisi sonucunda oluşur (31) IL-8 'ın salınımı IL-2 ve anti-CD16 monoklonal antikorlarının sinerjistik etkisiyle olur. IL-4, TGF-  $\beta$  ve glukokortikoidler IL-8 üretimini transkripsiyonel düzeyde inhibe eder.

IL-8, in vitro olarak T hücreleri, bazofiller, nötrofiller üzerinde önemli kemotaktik aktiviteye sahiptir. IL-8, nötrofiller aracılığıyla lizozomal enzimlerin salınımından, vasküler endotel yoluyla, nötrofillerin göçü ve yapışmasında önemli bir role sahiptir (31). IL-8 hedef hücrelere spesifik reseptörler aracılığıyla yapışır. Normal insan T hücrelerinin hemen hemen her hücrede 300 yapışma alanı vardır ve IL-8 yanıtı nötrofillerden 10 kez daha düşüktür (31). IL-8, diğer sitokinlerdeki gibi hücreye ligand-reseptör kompleksinin oluşmasında kendi reseptörlerini kullanır. Reseptörler, de novo protein sentezinin bulunmadığı durumlarda yeniden sentezlenir ve bu yeniden sentezlenme olayı IL-8 'in sinyal iletiminde esansiyel rol oynar.

IL-8'in yangıdaki temel rolü, neoplastik hastalıklarda ve insan sinir sisteminin infeksiyöz yangısında üretilmesiyle doğrulanır ve bu hastalıklarda lökositlerin infiltre olduğunu gösterir (32).

#### 2.2.6. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ( TNF):

TNF antitümoral aktivitesi ile tanımlanan yangı ve hücrel immün yanıtın aracıdır. TNF  $\alpha$  ve TNF-  $\beta$  olmak üzere iki farklı TNF molekülü vardır ki; TNF  $\alpha$  sadece % 30 oranında TNF- $\beta$  ile homologdur. İkisi de aynı reseptörlere ve benzer aktiviteye sahiptir. Lipopolisakaritler (LPS) tarafından sitümüle edilen makrofajlar TNF'nin temel kaynağıdır. IFN-  $\gamma$ ; LPS tarafından indüklenen TNF salınımını yapma gücüne sahiptir. TNF kendi sentezini indükler ve salınımını monositler aracılığıyla yapar. IL-1, IL-2 GM-CSF, CSF-1 monositlerden TNF salınımını indükler (33).

TNF-  $\alpha$  aktive edilmiş monosit/makrofajlar ve daha az olarak da aktif T hücreleri (Th1 hücreleri), B hücreleri, naturel killer hücreleri, mast hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, mikroglia hücreleri, astrositler, Kupffer hücreleri, düz kas hücreleri, sinovial boşluk hücreleri ve bazofiller gibi bir çok hücre tarafından üretilir (27).

TNF-  $\alpha$  önceleri; kaşektin, sitotoksin, sitotoksik faktör, değiştirici-indükleyici faktör, hemorajik faktör, makrofaj sitotoksik faktör, makrofaj sitotoksin, ve nekrozin olarak biliniyordu. TNF- $\beta$  ise sitotoksin, değiştirici-indükleyici faktör, lenfotoksin olarak biliniyordu. Genellikle TNF- $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 'dan daha az sentezlenir. TNF-  $\beta$ 'nın dolaşımdaki tesbiti kolay değildir ve lokal olarak sentezlenen bir parakirin faktör olarak düşünülür, yani sistemik hasarın bir göstergesi olamaz.

TNF- $\alpha$ , bakteri (endotoksin, LPS), viruslar, protozoonlar, sitokinler (IL-1, IL-2 GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  kendi kendine), immün kompleksler, komplement komponenti C5a, nöropeptid substans P, ve reaktif oksijen türleri aracılığıyla sentezlenir. TNF- $\alpha$ 'nın üretimi; NO, reaktif oksijen türleri, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve hipokside artar (27).

TNF reseptörleri bir çok hücre tipinde bulunduğundan, TNF'nin çok geniş bir oranda hücre ve organ sistemleri üzerinde etkinliği vardır (33). TNF'nin temel fonksiyonu monosit ve makrofajların farklılaşması ve aktivasyonudur. TNF, parazit ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik makrofajların aktivasyonu için IFN- $\gamma$  ile sinerjist olarak çalışır (33).

IL-1, IL-2 veya IL-7, TNF gibi diğer sitokinlerin varlığı timosit proliferasyonunu artırır (34). TNF, stimüle olmuş T hücrelerinden, yüksek affiniteli IL-2R salınımı yoluyla IL-2 yanıtını, IL-2 ve IFN- $\gamma$  üretimini artırır (35). TNF, GM-CSF, G-CSF, IL-1 ve IL-6 gibi bazı diğer sitokinlerin de salınımını endotel hücreleri aracılığıyla indükler. TNF endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin salınımını artırarak lökosit miktarını artırır (33).

TNF, yangı, vasküler permeabilite ve şok gibi bir çok patolojik durumda yüksek düzeylerde bulunur. TNF, in vivo olarak tümör hücrelerinde hemorajik nekroz oluşturur. Bu etki tümör hücrelerinde ve antitümör yanıtın immün etkilerinde direkt ve indirekt olarak etki yapar.

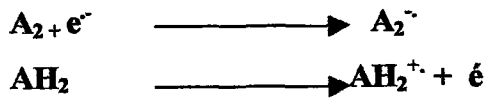
### 2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (SERBEST RADİKALLER)

Serbest Radikaller eksik elektronlu moleküller oldukları için herhangi bir molekülle etkileşime girer ve bu moleküllerden ya bir elektron (e-) alır veya bir e- verir. Başka moleküllerle reaksiyona giren ve onların kimyasal yapısını bozan yüksek aktiviteye sahip kimyasal moleküllere serbest radikaller, oksidan moleküller, reaktif oksijen türleri denir (36). Serbest oksijen radikalleri arasında en önemlileri; süper oksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), hidroperoksil radikali ( $HO_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), peroksit radikali ( $LOO^\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO^\cdot$ ) ve azot dioksit ( $NO_2$ ) bulunur (37). Bu reaktif oksijen ve nitrojen türleri, normal hücre fonksiyonunda bulunan nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi bileşenlere ve diğer intrasellüler organellere verdikleri zararlar birlikte normal aerobik hücre metabolizmasının ara ürünleridir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller daha çok karbon, oksijen ve sülfür atomlarından kaynaklanır. Bir çok araştırma oksijen kaynaklı olan hidroksil ve superoksit radikalleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Hidrojen peroksit de hücre hasarı yapar. Fakat yapısında ortaklanmamış elektron bulunmadığından serbest radikaller sınıfına dahil etmeyenler de vardır.  $OH^\cdot$  radikali serbest radikaller arasında en çok hasar verici ajanlar arasındadır (36). Hücreler

serbest radikallerin verdiği hasardan endojen radikal toplayıcı proteinler, enzimler ve kimyasal bileşikler ile korunur. Reaktif Oksijen Türleri (ROT); ROT ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik sonucu oluşur ki bu da karaciğer hastalıklarını içeren patolojik durumlarda meydana gelir. Serbest Radikallerin; yangı (38), kanser (39), iskemi reperfüzyon hasarı (40), yaşlanma (39), ateroskleroz (39), diabet (39), viral hepatit (41), Wilson Disease (4,5), Hematokromatozis, parasetamol zehirlenmesi gibi ilaç zehirlenmelerinde oluşan karaciğer hasarında rolleri olduğu bildirilmiştir.

### Serbest Radikaller üç temel yolla oluşur:

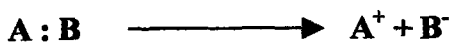
**1.Elektron Transferi:** Normal bir moleküle bir elektron eklenir veya çıkarsa serbest radikal oluşur.



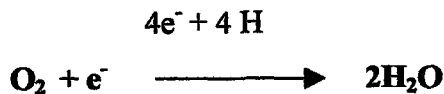
**2.Homolitik Parçalanma:** Normal bir molekülde bulunan bir kovalent bağın ayrılmasıyla iki tane serbest radikal meydana gelir. Bu parçalanma daha çok nonpolar çözeltilerde gaz fazında oluşur. Yüksek ısı, güneş ışığı ve peroksitler tarafından katalizlenebilir.



**3. Heterolitik parçalanma:** Normal bir molekülde bulunan bir kovalent bağ, içerdiği iki elektron da komponentlerin birinde kalacak şekilde parçalanır ve iki adet farklı yüklü iyon oluşur. Bu reaksiyon daha çok polar çözeltilerde oluşur ve B<sup>-</sup> nükleofilik (bazik), A<sup>+</sup> ise elektrofilik (asidik) komponenttir. (43)

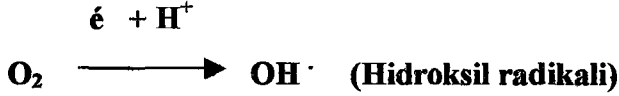
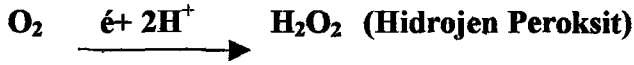
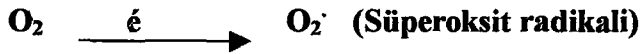


Organizmada oluşan serbest radikallerin büyük bir bölümü metabolik reaksiyonlar sırasında oksijenin tek elektronlu indirgenmesi sonucu oluşur.

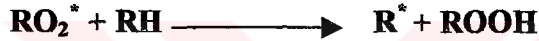
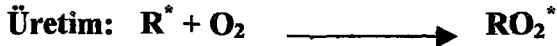
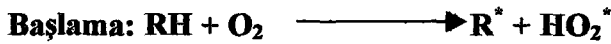




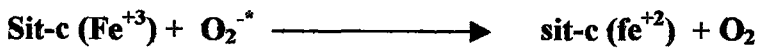
**Bu reaksiyonun birer elektronlu basamakları :**



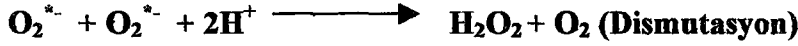
**Moleküler oksijen tarafından organik bileşiklerin oksidasyonu:**



**2.3.1. SÜPEROKSİT RADİKALİ ( $\text{O}_2^{\cdot}$ ) :** Moleküler oksijen; dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında; ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında ve spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), iki elektron alması ile peroksil anyonu ( $\text{O}_2^{2-\cdot}$ ) oluşur. Peroksil anyonu ortamda iki proton alarak hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oluşturabilir. Veya süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron taşıyıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Böylece bir indirgeyici gibi davranabilir. Ya da iki süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Örneğin ferri sitokrom c'nin yada Nitro Blue Tetrazoliminun (NBT) redüksiyonunu sağlarken, bir elektron kaybeder ve dioksijen ( $\text{O}_2$ ) haline gelir:



İki süperoksit radikali birbirleriyle etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri redüklenir. Böylece  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2$  meydana gelir:



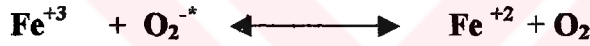
Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye “ Dismutasyon Tepkimesi ” denir. Bu reaksiyon kendiliğinden veya SOD enzimi aracılığıyla gerçekleştirilir (38).

Süperoksitin nitrik oksit (NO) ile etkileşimi fizyolojik öneme sahiptir. NO ile süperoksit reaksiyona girerek peroksinitrit ( $\text{ONOO}^{\bullet -}$ ) oluşumuna neden olmaktadır.



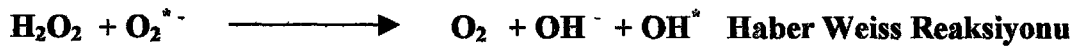
Peroksinitritlerin direkt olarak proteinler üzerine zararlı etkileri vardır. Peroksinitrit nitrojen dioksit ( $\text{NO}_2$ ), hidroksil radikali (OH), ve nitronyum gibi başka reaktif ürünlere de dönüşür (45).

Oksitlenmiş geçiş metalleri redüksiyonu da süperoksit ile olabilir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü olan redox reaksiyonları ile olur.

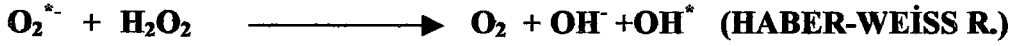
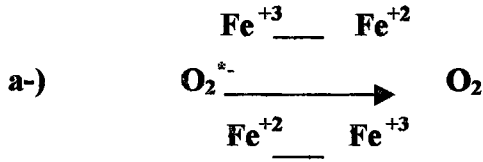


### 2.3.2. HİDROKSİL RADİKALİ:

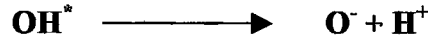
İlk olarak 1937 yılında, Haber ve Weiss, hidrojen peroksitin süperoksit radikalleriyle indirgenmesi sonucu oluşabileceğini göstermişlerdir. OH $\cdot$  Radikali, oldukça reaktif, çok kısa yarı ömürlü bir oksitleyici ajandır. Bu nedenle bu molekülü canlı sistemlerde direkt olarak saptamak çok zordur (39).  $\text{H}_2\text{O}_2$  'nin yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması ve fotolizi gibi bir çok yolla, OH $\cdot$  radikali oluşabilir. Fakat biyolojik sistemlerdeki temel kaynağı, “Haber-Weiss” ( $\text{H}_2\text{O}_2$  'nin geçiş metalleri aracılığıyla indirgenmesi reaksiyonudur.



Fizyolojik şartlarda OH $\cdot$  radikali oluşması için  $\text{O}_2^{\bullet -}$  radikalinin elektronunu  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye aktarak süperoksit radikalini indirgemesi, süperoksit radikallerinin kendiliğinden dismutasyonuna göre çok yavaştır.(39) Bunun için Haber – Weiss isimli araştırmacılar geçiş elementlerinin katalizörlüğünde bu reaksiyonun hızla gerçekleştiğini gösterdiler. (40)

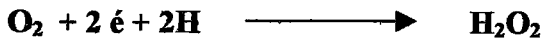
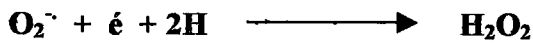


Son derece zararlı bir reaktif olan  $\text{OH}^*$  radikalinin, biyolojik sistemlere fizyolojik ve patolojik etkileri vardır. Çok zayıf bir asit özelliğindedir. Ve alkali ortamda  $\text{O}^-$  vererek dissosiyeye olur.



$\text{OH}^*$  radikalinin pK 'sı, bir hidroksil dimeri olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile aynı yani 11.85 'tir. Hidroksil ve süperoksit radikalleri 240 nanometrede (nm) maximum absorpsiyon verirler. Fakat bu iki radikallerden eşit miktarlarda alınıp 240 nm' de absorpsansları ölçüldüğünde,  $\text{OH}^*$  radikalinin absorpsansı,  $\text{O}^-$  radikalinin absorpsansının 2 katı olduğu görülmüştür (46).

**2.3.3. HİDROJEN PEROKSİT ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) :** Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron (é), süperoksidin ise 1 é alması ile oluşmaktadır.

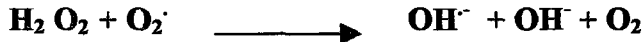


Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Tepkime sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir **dismutasyon** tepkimesidir.

Bu tepkime kendiliğinden veya SOD enzimi tarafından katalizlenir. Kendiliğinden dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Süperoksidin SOD tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Özellikle kendiliğinden dismutasyon nötral ve alkali pH'da daha yavaş olduğundan, enzimatik dismutasyon daha belirgindir (18). Hidrojen peroksit, ortaklanmamış elektrona sahip olmadığından dolayı, serbest radikal tanımına

uymaz, fakat reaktif oksijen türleri (ROT) sınıfına dahildir. Organik hidroperoksitler (ROOH), alkoksil (RO<sup>•</sup>), peroksil (ROO<sup>•</sup>) radikalleri ve NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> gibi azot içeren radikaller bulunur (39,40). Serbest radikal tanımına uymayan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yüksüz olduğundan dolayı membranları diffüzyonla kolayca geçebilir. Süperoksit ise (-) yüklü olduğundan anyon kanalı bulunan membran olmadıkça (anyon kanalı bulunan tek membran eritrosit membranıdır.) membranlardan difüzyonu çok zordur. Bu yüzden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 'nin giremediği membranlara da girer ve hasar oluşturabilir (40).

Hidrojen peroksit süperoksit radikali ile tepkimeye girerek, en reaktif ve zarar verici oksijen radikali olan hidroksil radikali oluştur.



Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi adı verilir. Bu tepkime ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşebilir. Fakat katalizörsüz tepkime oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen tepkime oldukça hızlıdır. Bu tepkimede önce ferri demir (Fe<sup>+3</sup>), süperoksit tarafından ferro demire (Fe<sup>+2</sup>) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir Fenton tepkimesi ile hidrojen peroksitten OH<sup>-</sup> ve OH<sup>•</sup> üretilir (47).



Metal katalizörlerin bulunmadığı durumlarda, süperoksit ve hidrojen peroksit kolayca ortamdan uzaklaştırılarak zararsız hale getirilebilir. Bazı bakteri ve hayvan hücreleri, az miktar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile hasar görürken, bazıları da çok miktarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebilir (40). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daha çok katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX) tarafından parçalanarak detoksifiye edilir.

Etilen diamine tetra asetik asit (EDTA) gibi bazı şelatlayıcı ajanlar hidroksil radikal oluşumunu Haber-Weiss tepkimesi aracılığıyla aktive ederken, Dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) gibi bazı bileşikler ise inhibe ederler.

#### 2.3.4. TEKİL (SİNGLET) OKSİJEN (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>):

Moleküler oksijenin dış yörüngesindeki orbitallerde (2p), çiftleşmemiş ve paralel olarak bulunan iki elektron vardır. Enerji absorpsiyonuyla bu elektronların spin yönleri değiştirilebilir. Ve eşleşerek aynı orbitalde bile bulunabilirler. Manyetik alanda emisyon spektrumunda tek bant verdiği için bu isim verilmiştir. Radikal değildir. Singlet oksijenin 2 formu vardır: (43)

**Moleküler Oksijen**  $^3\Sigma_gO_2$   $\uparrow$   $\uparrow$

**$\Delta$  (Delta formu)**  $^1\Delta_gO$   $\circ$   $\uparrow\downarrow$

**$\Sigma$  (sigma Formu)**  $^1\Sigma^+_gO_2$   $\downarrow$   $\uparrow$

Singlet oksijenin **Delta ( $\Delta$ )** formunda iki elektron aynı orbitalde bulunur, ve spinleri birbirine zıttır. **Sigma ( $\Sigma$ )** formunda ise ayrı orbitallerde ve spinleri birbirine zıttır. Sigma formunun enerjisi daha fazladır, daha az kararlıdır, ve sulu çözeltilerde yarı ömrü  $10^{-11}$  saniyedir. Delta formunun yarı ömrü daha uzun olduğundan ( $2 \times 10^{-6}$ ) kimyasal reaktiviteden delta formunun sorumlu olduğu düşünülmektedir (40,43).

***In vivo* şartlarda singlet oksijen oluşumuna sebep olan mekanizmalar şunlardır:**

1- Süperoksit radikali üretilen ortamda kendilğinden dismutasyon ile;



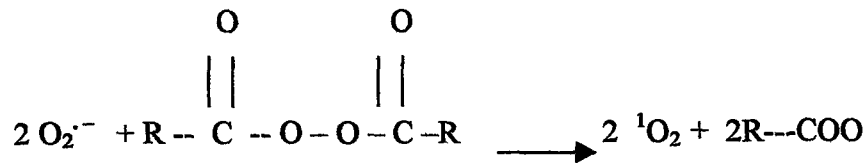
2.  $O_2^{\cdot-}$  ile  $HO^{\cdot-}$  nin etkileşmesiyle;



3. Haber- Weiss tepkimesi ile;



4. Süperoksit radikallerinin diaçilperoksitlerle tepkimeye girmesi ile;



5. Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında  $H_2O_2$  ve halojen bağımlı miyeloperoksidaz enzimi ile;



## 6. Moleküler oksijene pigment aracılığıyla ışığın etkisi ile;

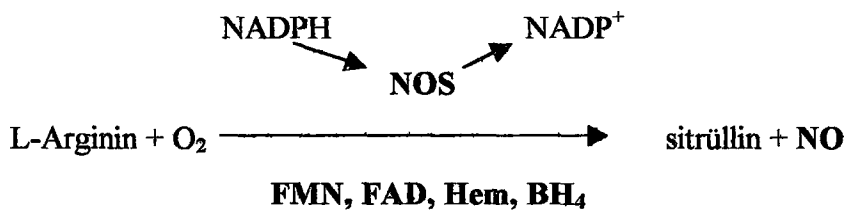
Işığın etkisiyle singlet oksijen oluşumu reaksiyonları çok önemlidir. Işık varlığında, pigment ışığı absorbe ederek daha yüksek elektronik eksitasyon durumuna geçer. Daha sonra pigment, üzerindeki enerjiyi moleküler oksijene aktararak, dış iki orbitalindeki paralel olan spinlerin yönünü tersine çevirir ve singlet oksijen oluşur.

Bu sebeplerden anlaşılacağı üzere; singlet oksijen ve hidroksil radikallerinin üretimi,  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  moleküllerinin ortamda birikmesine bağlıdır. Bu iki bileşiğin ortamdaki uzaklaştırılmadığı durumlarda, iki molekülün birbiriyle karşılaşması sonucu,  $^1O_2$  ve  $\cdot OH$  radikali üretilir (43).

### 2.3.5. NİTRİK OKSİT ( $NO\cdot$ )

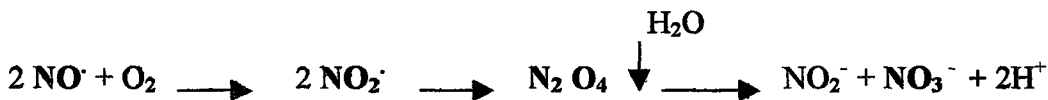
**Yapısı ve Kimyasal özellikleri:** Nitrik oksit azot monoksit olarak da adlandırılan oldukça toksik olan renksiz bir gazdır. Serbest radikal tanımına uyar ve yarı ömrü çok kısadır (49). Lipofilik özellikte olup, oksijen varlığında stabildir ve suda erir (50). Düşük dozlarda toksik değildir ve fizyolojik olarak önemli rolleri vardır (49,50).

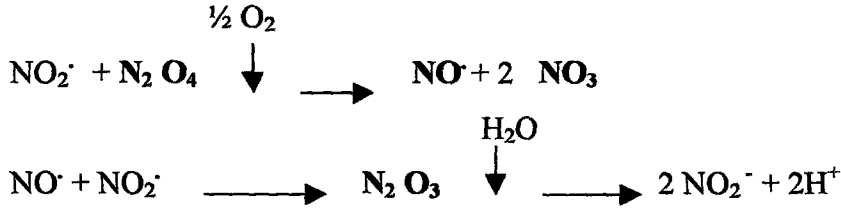
Nitrik oksit, L-argininden NOS (Nitrik oksit Sentetaz) aracılığıyla sentezlenir. NOS, sit.P-450 gibi Fe içeren protoporfirin IX 'a sahiptir (51). NOS, L-argininden moleküler oksijen ve Hem, FAD, FMN, ve  $BH_4$  (tetrahidrobiopterin) kofaktörleri aracılığıyla Sitrülin ve NO oluşturur. Sit.P-450 redüktazdaki gibi moleküler oksijen protoporfirine bağlanmadan önce  $Fe^{+3}$  'ü  $Fe^{+2}$ 'ye dönüştürür. Yine NOS uyarıldığında iki moleküler oksijen L-arginine girerek bazı ara ürünler oluşturarak NO ve sitrullin üretilmektedir (52).



Şekil:4 NO sentezi

$NO\cdot$  elektriksel olarak yüksüz olduğundan, reseptöre bağımlı olmayan yollarla kolayca membranlardan difüze olabilir (49).  $NO\cdot$  aşağıdaki gibi bir seri nitrojen dioksitlerine dönüşebilir.





### Nitrojen Oksitlerinin etkileri:

**NO $\cdot$**  (Nitrik oksit) : Serbest Radikal

**NO $_2 \cdot$**  (Nitrojen dioksit) : Serbest Radikal, Nitroze edici ajan

**N $_2$  O** (Nitröz oksit) : Anestezik

**N $_2$  O $_3$**  (Dinitrojen trioksit) : Nitroze edici ajan

**N $_2$  O $_4$**  (Dinitrojen tetraoksit) : Dimerik NO $_2 \cdot$ , nitroze edici ajan

**NO $_2^-$**  (Nitrit) : Asidik ortamda NO oluşturur.

**NO $_3^-$**  (Nitrat) : Stabil Anyon

Nitrojen oksitleri (NO $_x$ ) aminleri nitroze ederek, nitrozaminleri oluşturur.



Nitrozaminler, DNA'da nitrozilasyon, deaminasyon, ve alkil nükleofillerinin oluşumlarına neden olabilirler. Bu şekildeki mutasyonlar onkojenleri indükleyerek malign transformasyon oluştururlar (49,53). Ayrıca NO $\cdot$ , aminoasitlerde S-nitrosotiol oluşumu ile, karbonhidratlar ve pürinlerde de hasar verirler. Böylece nitrojen içeren bileşiklerin yangı ve vasküler hastalıklarda önemli rolleri olduğu doğrulanmaktadır (54).

NO $\cdot$  bir elektron alarak **nitroksil** anyonuna (NO $^-$ ), bir elektron kaybederek **nitrozonyum** (NO $^+$ ) kationuna dönüşür.



NO $\cdot$ 'nun düşük konsantrasyonları oksijenden çok hemoglobine bağlanarak, hemoglobin oksijen formunda iken NO $\cdot$ 'yu önce NO $_2^-$  (nitrit) daha sonra da NO $_3^-$ 'a (nitrat) oksitler ve kendisi methemoglobine dönüşür (50).

### Nitrik Oksitin etki mekanizması :

- NO $\cdot$  üretildiği hücreden çıkıp, direkt hücre içine girerek hedef moleküle bağlanıp direkt veya enzim aktivitesini değiştirerek etkisini gösterir.
- NO $\cdot$ 'in nörotransmitter, tümör hücre ölümü, yangıda önemli rolü vardır.
- NO $\cdot$ 'nun en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi moleküllerdir (49).

- Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak, antitümoral ve antimikrobiyal etki gösterir.
- Mitokondriyal elektron transport sisteminin enzimlerinin aktivitesini azaltır (50).
- Tümör hücresindeki ribonukleotid reduktazı inhibe ederek DNA sentezini engeller (53).
- Ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salımına yol açabilir bu da organik ve lipid peroksidasyonuna neden olabilir (49,50).
- NO sülfhidril (S-H) grubuyla reaksiyona girerek S-nitrozilasyon yapabilir ve plazminojen aktivatörü gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonunu artırabilir.
- NO süperoksit ( $O_2^-$ ) molekülü ile reaksiyona girerek önce peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) daha sonra nitrojen dioksit ( $NO_2^-$ ) ve hidroksil radikali (OH) oluşturabilir (45). Bu oluşumlar da tirozini 3-nitrotirozine ( $NO_2Tyr$ ) dönüştürür (55).  $NO_2Tyr$  düzeyinin oksidatif hasarın bulunduğu durumlarda arttığı ve aterosklerozis, septik şok, nörodejeneratif hastalıklar, akut akciğer hasarı, organ transplantasyonu, yangılı barsak enfeksiyonları, romatoid artirit, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, yaşlanma ve sigara içenlerde arttığı gözlenmiştir (56).

### 2.3.5.1. NİTRİK OKSİT SENTETAZ (NOS):

NO sentezlenmesini sağlayan NOS enziminin iki izoenzimi vardır.

#### A-) Yapısal (Konstitüf) NOS (cNOS) :

Bu izoenzimin aktivitesi ikincil haberci  $Ca^{++}$ 'ya bağlıdır. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks, cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir.  $Ca^{++}$ 'u artıran uyarı kesilince, hücre içi  $Ca^{++}$  'da azalmaya başlar. cNOS enzim aktivitesi ortadan kalkarak NO sentezi durur. Bu nedenle cNOS enzimi normal biyolojik sistemlerde az miktarda NO sentezler. cNOS bulunduğu hücrelerde ancak  $Ca^{++}$  aktivitesi yükselince aktif duruma geçer. İnsan vücudunda tesbit edildikleri başlıca dokular; damar endotel hücreleri, ürogenital sistem dokuları, santral ve periferik sistem nöronları, adrenal korteks ve medulla hücreleri, trombositler ve barsak intersitiumudur.

Yapısal NOS'ta iki bölümde incelenmektedir: nNOS (nöronal) ve eNOS (endotelial)'tur.

- 1- **nNOS kaynaklı NO:** Temel olarak sinir sisteminde bulunmakla birlikte başka dokularda da tesbit edilmiştir.



**a-) Mekezi Sinir Sistemi:**

- Nörotransmitter/nöromodulatör olarak görev yapar. En düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Presinaptik uçtan salınan glutamatın etkisiyle, postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'u aktive edilir ve NO sentezlenir.
- Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur.
- Koku alma, görme, ağrı algılama ve hafızanın oluşmasında görev alır.

**b-) Periferik Sinir Sistemi :**

- Noradrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak görev yapar.
- Solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, gastro intestinal sistem motilitesinde, mesana sfinkterinde ve bu organların kan basıncı ve akışının düzenlenmesinde rol alır.

**2- eNOS kaynaklı NO :**

- Düz kasları gevşeterek kan basıncı ve akış hızını regüle eder.
- Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder.
- Endotel hücre ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkisi vardır.

**B-) Uyarılabilir (İnducible) NOS (iNOS)**

İlk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. iNOS aktivitesi için kalsiyuma bağımlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. Fakat, kalmodulinin buradaki rolü bilinmemektedir. iNOS başta makrofajlar (monosit, histiyosit, kuppfer hücreleri gibi) olmak üzere polimorf nükleer lökositler (PMNL), hepatositler, damar düz kası, damar endoteli, astrositler ve kondrositler tarafından üretilir. Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, uzun süre devam eder (51,52,57). Özellikle nonspesifik immünitede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, protozoonlara, tümör hücrelerine sitotoksik veya sitostatik etki gösterir. Yangısel ve otoimmün hastalıklarda da rol oynamaktadır. (52). iNOS normalde hücre içinde bulunmaz. Ancak bakteriyel ürünler ve sitokinler ile temastan sonra, miktarı (transkripsiyonel indüksiyon: mRNA artışı) artırılır (49,51).

**Tablo3: cNOS ile iNOS Arasındaki Farklar:**

	cNOS	iNOS
Ca <sup>2+</sup> bağımlılık	Var	yok
NO oluşum Düzeyi	pikomol	nanomol
Uyarana Yanıt	Hemen	Geç
NO üretim süresi	Kısa	Uzun
Glukokortikoidlerin Etkisi	Etkilenmez	İnhibe edilir

### 2.3.6. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ORGANİZMADAKİ OKSİDATİF HASAR MEKANİZMASI:

Reaktif oksijen türleri (ROT) nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu molekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmadaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedir (37,40).

ROT'ların içinde en reaktif olanı hidroksil radikalidir ve yarı ömrü oldukça kısadır. Bu yüzden mitokondriler veya mikrozomlarda oluşan serbest radikallerin, hücrenin diğer bölümlerini (örn; DNA) direkt olarak etkilemesi pek mümkün değildir. Ancak bir serbest radikal, radikal olmayan bir moleküle etkileşerek, onun serbest radikal haline gelmesine neden olabilir. (serbest radikal indüksiyonu) ve bu olay, zincir şeklinde bir reaksiyonu başlatabilir (58). Böylece serbest radikaller, oluştukları yerlerin uzağındaki hücrenel komponentlere bu zincirleme reaksiyonların yıkım ürünleri aracılığıyla etki edebilirler. İki serbest radikal karşılaştığı zaman, birbiriyle reaksiyona girerek radikal olmayan stabil bir molekül de oluşturabilir. Bu durum, serbest radikal indükleme zincirinin sonlanmasına neden olur (59).

Süperoksit molekülü; çok reaktif olmakla birlikte hidroksil radikali kadar hasar verici değildir; hidrojen peroksit varlığında, geçiş metalleri aracılığıyla hidroksil radikali oluşturabileceğinden dolayı, oldukça hasarlayıcı bir potansiyele sahiptir (60,61). Oluşumlarına neden olduğu diğer radikaller ile birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranır. O<sub>2</sub><sup>-</sup> sülfidril gruplarının disülfidlere oksidasyonu ve ferrik demirin ferroz formuna oksitlenmesine neden olur (62). Ayrıca diğer metallere elektron vererek veya elektron alarak, organizmada fonksiyonel metallerin oksido-redüksiyon düzeyini bozar (62). Sülfidril gruplarının ve metal iyonlarının canlıdaki sayısız fonksiyonları göz önüne alındığında, radikallerin, hücrede metabolik olayları ve oksido-redüksiyon potansiyelini değiştirerek sayısız etkilere neden olacağı açıktır.

Hidrojen peroksit, hücreye direkt hasar vermez. Fakat tüm biyolojik membranlardan kolayca geçebilir. Süperoksit varlığında hidroksil radikaline dönüşebilir. İşte bu nedenle güçlü hasar verici etkisi vardır (40,46).

Hidroksil radikali ise etrafındaki hemen hemen her biyomolekülle reaksiyona girebilir. Lipid peroksidasyonunu başlatma , DNA da kırılma ve hasarlanmalar, enzimlerin aktif merkezlerindeki SH ve benzeri grupların oksitlenmesi, polisakkaritlerin depolimerizasyonu gibi değişik hasarlanmalar yapabilir (37).

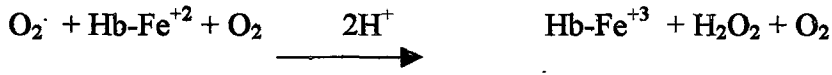
### 2.3.6.1. SERBEST RADİKALLERİN PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİLERİ:

Proteinlerin, serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri, amino asit içeriklerine ve kompozisyonuna bağlıdır. Hidroksil ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana getirirler. Bu reaksiyonlar sonucunda immunglobulin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Nitekim serum proteinlerinde, kataraktlı lens proteinlerinde ve inflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerin sinoviyal sıvılarındaki IgG 'lerinde serbest radikal hasarı tesbit edilmiştir (43,63).

Sitoplazmik ve membran proteinleri ozon ve protoporfirin IX gibi okside edici ajanlara maruz kaldıktan sonra çapraz bağlanarak dimerleşir veya daha büyük agregatlara dönüşürler. Prolin ve lizin, süperoksit radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Proteinler üzerine olan serbest radikal hasarı birikmişse veya belirgin proteinlerin spesifik bölgeleri üzerine yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etkiler yapar (43).

Süperoksit radikalleri başta sistein, triptofan ve tirozin olmak üzere bütün amino asitlerle; perhidroksi radikali ise süperoksit radikalinden daha etkili olarak sistein, fenilalanin, histidin, serin ve metiyonin aminoasitleri başta olmak üzere bütün amino asitlerle tepkimeye girer. Buna rağmen bu iki radikalın amino asitlerle tepkimesi hidroksil radikalınıninkinden  $10^6 - 10^9$  kez daha yavaştır. Süperoksit radikalleri ve perhidroksi radikali ise radikalleri ile  $H_2O_2$  'nin biyolojik moleküllerle tepkimelerinin yavaş olması nedeniyle, radikallerin gözlenen toksik etkisi  $^1O_2$  ve  $OH\cdot$  'den kaynaklandığı kabul edilmektedir (64).

“Hem” proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2\cdot$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur.



### 2.3.6.2. SERBEST RADİKALLERİN DNA ÜZERİNE ETKİLERİ:

Serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar. Sitotoksite, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Singlet oksijen ve özellikle hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek; tek ve çift zincir kırılmalarına, baz dizilim değişikliklerine ve baz eksilmelerine sebep olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerdeki doymuş karbon atomlarından, hidrojen atomu çıkarılması veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan reaksiyonlarda rol alır. Bu olayların sonucunda mutagenез, karsinogenез ve hücre ölümü oluşabilir (43,65). Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksid membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli bir hedeftir.

T lenfositleri genelde serbest radikal saldırısına karşı daha hassasdırlar. İn vitro deneylerde serbest oksijen radikallerinin, T-süpressör hücreleri için T helper hücrelerine göre daha sitotoksik oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, serbest radikal reaksiyonlarının, immün süpressör hücrelerin, otoimmün reaksiyonları kontrol etmelerini engelleyebilecekleri görüşünü desteklemektedir (43).

### 2.3.6.3. SERBEST RADİKALLERİN KARBONHİDRATLAR ÜZERİNE ETKİLERİ :

Serbest oksijen radikallerinin karbonhidratlar üzerine, polisakkarit depolimerizasyonu ve monosakkarit otooksidasyonu gibi etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunlar diyabet (66) ve sigara içimi (67) ile ilişkili kronik hastalıklarda önemli rol oynar.

Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Poliansature yağ asitleri (PUFA) ve karbonhidrat oksidasyonunun ürünü olan glyoxal'ın hücre bölünmesini inhibe ettiği bildirilmiştir (63).

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyaluronik asit (glukronk asit+ N-asetil glukozamin), sinoviyal sıvıda da bol bulunur. İnflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya bol miktarda polimorf nükleer lökositler geçer. Ve muhtemelen immün

komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstrasellüler sıvıya  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  salarlar. Bu radikalleri in vitro hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir. Hiyaluronik asit parçalanması inflamatuvar hastalıklarda sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir (63, 68).

#### 2.3.6.4. LİPİDLER ÜZERİNE ETKİLERİ:

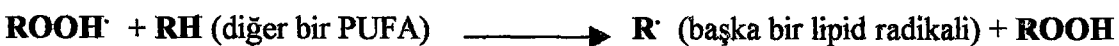
Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oluştuğu zaman organizmada değişik bozukluklara yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. PUFA'nın oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Membran akışkanlığı, geçirgenliği, hareket yeteneği, transmembran iyonik gradyenti bozulur ve oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (58). Otoksidasyon reaksiyonları zinciri olan lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan  $OH^{\cdot}$ ,  $HO_2$  ve  $^1O_2$  gibi reaktif bir serbest radikal ile membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin (RH), karbon zincirindeki metilen gruplarının birinden, bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Daha az reaktif olan süperoksit ve hidrojen peroksit bu reaksiyonu direkt başlatmaz. Böylece PUFA'nın karbon zinciri, doymamış bir lipid radikali ( $R^{\cdot}$ ) haline gelir.



Oluşan bu lipid radikali oldukça kararsız bir bileşiktir ve stabilizasyonu için dien konjugasyonu ile çift bağların normal yeri değişerek, dien konjugatı oluşur. Ardından bu konjugat oksijen etkisine maruz kalarak, lipid peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) meydana gelir.

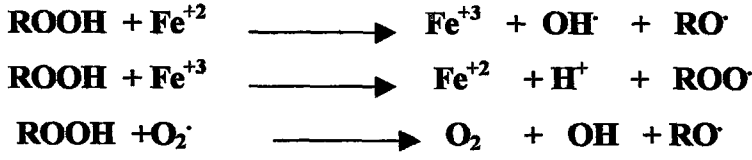


Lipid peroksil radikalleri, kendi yapıları içerisindeki düzenlemelerle lipid endoperoksitleri haline gelirler. Daha sonra membran yapısındaki diğer PUFA'ları oksitleyerek yeni zincir tepkimeleri başlatırken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alırlar ve lipid hidroperoksitlerine ( $ROOH$ ) dönüşür.



Bu reaksiyonlar yayılarak zincirleme devam eden lipid peroksidasyon reaksiyonlarına neden olarak yeni lipid hidroperoksitleri oluşur. Sonuçta oluşan ürün olan hidroperoksitler ( $ROOH$ ), süperoksit anyonu, perhidroksil radikali, yada geçiş metali iyonları temas edene kadar stabil kalırlar. Daha sonra bunlarla temas ettiklerinde lipid

hidroperoksilleri parçalanarak daha radikalik özelliğe sahip olan türlere (lipid alkoksil: RO<sup>•</sup>, lipid peroksil : ROO<sup>•</sup>, aldehit, lipid aldehid ve alkil radikaller gibi) çevrilirler.



Bunlardan özellikle lipid aldehitler (4-hidroksinonenal ve malondialdehit) oluştukları yerden diffüze olmak suretiyle, hücrenin diğer kısımlarına gidip hasar oluşturabilirler (69).

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden PUFA'ların peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonlarına neden olabilir. Bu yüzden membran deformasyonu, membran transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonları gibi patolojik sonuçları olabilir. Bu etkiler MDA'nın mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etkilerini açıklar (69,38).

#### 2.4. ANTIOKSİDAN ETKİ TİPLERİ

- 1. Toplayıcı (scavenger) etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek tutma veya daha zayıf bir bir moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler bu etkiye örnektir.
- 2. Bastırıcı (quencher) etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitamin, flavonoid, trimetazin, antasyonoidler.
- 3. Zincir kırıcı (chain breaking) etki:** Serbest oksijen radikallerini kendine bağlayarak zincir kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. - Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller.

#### 4. Onarıcı (repair) etki:

**Enzimler:** Mitokondrial sitokrom oksidaz, SOD, CAT, GPX, GOT, hidroperoksidazlar.

**Enzim olmayanlar:** Lipid, α-tokoferol, β-karoten

Ascorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, methionin, albumin, bilirubin, glutatyon (43).

#### Serbest radikal oluşumunun başlamasının azaltılması

1. Kalorik indirgenme
2. Diyetle serbest radikal oluşumunu engellenmesi için kısıtlama: Cu, Fe, Mn, PUFA, lizin
3. Spin-trap: N-tert-butyl-α-phenylnitrozine (PBN)
4. Şelasyon ajanları: EDTA, fitik asit, O<sub>2</sub> ile şelasyona giren geçiş metalleri indirgeyicileridir (44).

### Sebest radikal oluşumunun uzamasının azaltılması

1. Antioksidan enzimler SOD, CAT, GPX
2. Spin-tuzağı
3. Zincir kırıcı bileşikler:
  - a) BHT, BHA, etoksiquin, 21-amino steroid ve lazaroid
  - b) Doğal:  $\alpha$ -tokoferol, ascorbik asit,  $\beta$ -karoten, melatonin,  $\alpha$ -lipoik asit (44)

### Serbest radikal oluşumunun başlamasının

#### 1) Kalorik İndirgenme ile azaltılması:

Yiyecek alımının kısıtlanması ile  $O_2$  kullanımı azaltılabilir. Memeliler %90 ın üzerinde  $O_2$  yi mitokondride kullanır ve %1-3 ünü  $O_2$  ye dönüştürür. Yiyecek kısıtlaması serbest radikal başlamasını azalttığı için yaşam süresini uzatabilir.

Günlük % 40 oranında kalori kısıtlaması esansiyel besinler alınmak kaydıyla , vücut ağırlığını % 40 azaltır, yaşam süresini % 40 arttırır (44).

#### 2) Spin-tuzağı ile azaltılması:

Nitroz ( $>= N \rightarrow O$ ) veya nitroso ( $>N= O$ ) bileşikleri spin tuzağı olarak işlev görürler.

Serbest radikallerle ( $>N-O^{\cdot}$ ) stabil nitroksid oluşur. Bu da tamamen redükte olan hidroksilamin ( $>N-OH$ ) oluşturur.

Spin tuzakları antioksidandır. Biyolojik sistemlerde bunların antioksidan etkisi, N-tert-butyl- $\alpha$  phenyl nitrozla (PBN) yapılan deneyler sonucu, serbest radikallerden olan  $OH^{\cdot}$  ne PBN nin ilavesiyle nitroksid formu oluşturarak, mitokondriyal solunum zinciriyle hidroksilamin formuna dönüştürür. Bu bileşik daha sonra yeniden kolayca nitroksid formuna dönebilir. Bu solunum zincirinin siklik oksidasyonu ile sonuçlanır. Nitroksid,  $O_2$  nin elektronları için yarışır ve böylece süperoksid radikallerinden daha fazla hidroksilamin oluşturur.

### 2.4.1. ANTIOKSİDAN ENZİMLER:

#### 2.4.1.1. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX= EC.1.11.1.9):

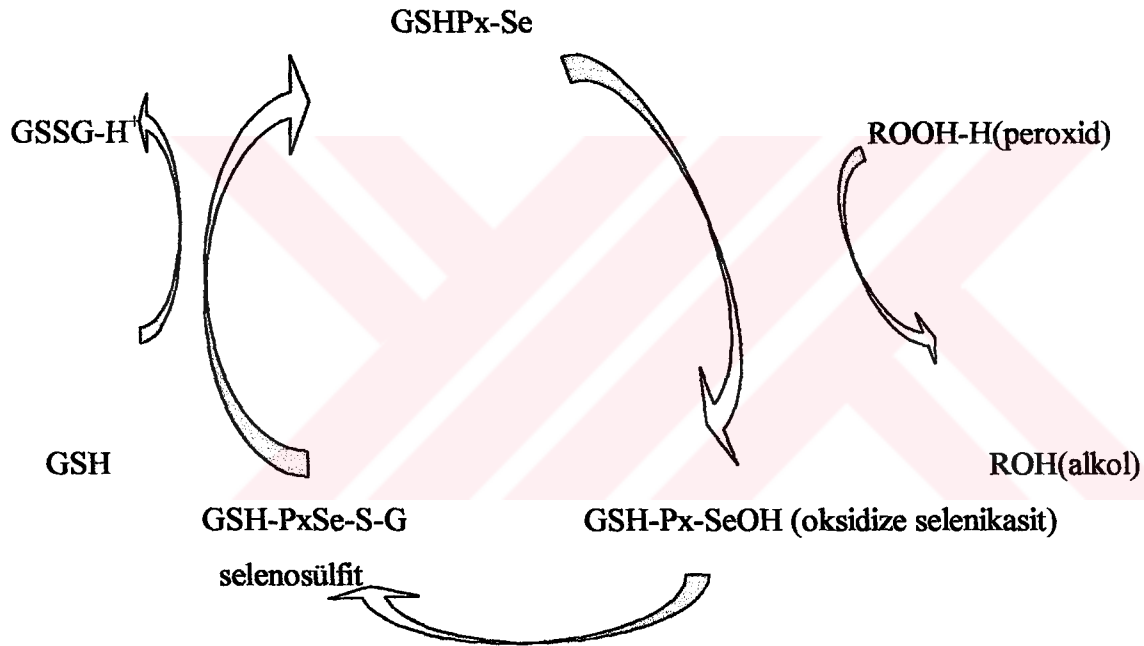
Hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizler. Tetramerik 4 Se atomu ihtiva eder. Sitozolik bir enzimdir (60,70). GSH-PX, hem ve diğer prostetik grupları içermez. Aşağıdaki reaksiyonları katalizler:





Memelilerde saptanan ve aynı fonksiyonu gören ikinci bir selenoenzim de, "Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz" (PLGSH-PX) 'dır. Monomerik solubl yapıda ve aktif bölgesinde bir selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir (40,70). Membran yapısındaki fosfolipid hidroperoksitlerini (PLOOH), alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda, membran fosfolipidlerinin peroksidasyona karşı en önemli koruyucusu, PLGSH -Px 'dir (40).

GSH-Px 'in aktif formu olan selenat hali (E-Se<sup>-</sup>), substratı olan peroksiti alkole indirgerken kendisi oksitlenerek selenik asite dönüşür (E-Se-OH). Glutatyon bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfit'i (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutatyonun selenosülfitte bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutatyon okside hale dönüşür (şekil:6)(43).



ŞEKİL :6 GSH-PX 'in katalitik mekanizması:

Okside Glutatyonun (GS-SG), tekrar kullanılması için NADPH ile redüksiyonu ile Glutatyon Reduktaz aracılığıyla, tekrar GSH 'a dönüşür.





GSHPx, solunum patlaması sırasında fagositik hücre hasarını önler. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin arttığı durumlarda GSHPx en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px deki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. GSH-PX hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'yi hem de organik hidroperoksitleri (kümen hidroperoksit gibi) sustrat olarak kullanabilir (71.43).

#### 2.4.1.2. GLUTATYON –S-TRANSFERAZLAR (GST) 8E.C.2.5.1.18):

GST, Se bağımsız GSH-Px tir.



GST ler aril transferaz, alkil transferaz, epoksit transferaz, aralkil transferaz, alkalen transferazlar gibi sınıflandırılır.

**Fonksiyonları:** Hem detoksifikasyon hemde hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak GSH daki sistein SH grubu ile yabancı maddeleri bağlayarak elektrofilik bölgeleri nötralize ederler. Oluşan ürün daha fazla suda çözünür. Oluşan bu GSH konjugatları metabolizmadan atılabilir ve daha ileri metabolize edilebilir. GSH dan glutamat ve glisin koparılır. Ve sisteinin serbest amino grubu , merkapturik asitlere dönüşür. Ksanobiotik klasik atılım ürünlerinden merkaptürik asitler yani N-asetil siateinin S - alkile olmuş türevleri safra ile atılır. GST lerin, kanserojen, mutajen maddelerin detoksifikasyonunda rolleri vardır. Hidrofobik, lipofilik bileşikler bağlarlar. Birçok pigment (bilirubin, hematin, BSP, indosiyanın green gibi) steroid hormonlar , polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu proteinle taşınır.

**———GST  $\mu$  :** GST ler karaciğerde sit P450' de oluşan ara ürünleri daha az reaktif konjugatlara dönüştürür. Epoksit konjugasyonu mutajen ve kanserojenlere karşı koruma sağlar.

**———GST II:** (Asidik) Fötüs karaciğerinde bulunur. Normal karaciğerde bulunmaz. Kimyasal maddelerle oluşan siça hepatomasında ve hiperplastik nodülde artar. Hepatomada tümör markıdır.

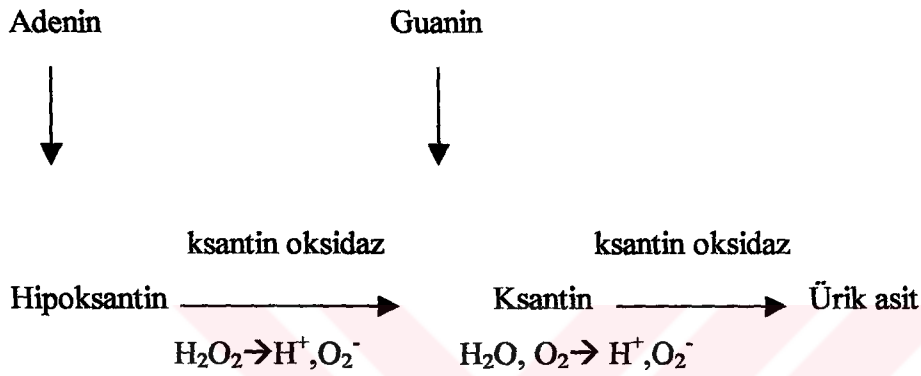
**———GST  $\alpha$  :** (Bazik) 10 haftalık gebelik sonrasında tüm karaciğerde bulunur. Serum GST konsantrasyonu AST ve ALT den daha duyarlı hepatoselluler hasar yapar. GST ler hem periportal, hemde sentrilobuler olarak bulunur. Aminotransferazlar ise daha çok periportal kısımda bulunur. Hipoksi ve toksik madde etkisiyle en çok hasar gören kısım sentrilobuler

bölgedir. GST ler küçük olduğu için ve sentrilobuler kısımda bulunduğu için erken karaciğer hasarında plazmaya salınır. Akut karaciğer hasarı ve kronik aktif hepatitte aminotransferazın aksine GST aktivitesi ile daha iyi belirlenir (43).

#### 2.4.1.3. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD) (E.C. 1.15.1.1, EC-SOD)

SOD, 1968 de Fridovich ve McCord tarafından bulunan, süperoksit radikalının hidrojen peroksit katalizleyen bir enzimdir (72,73).

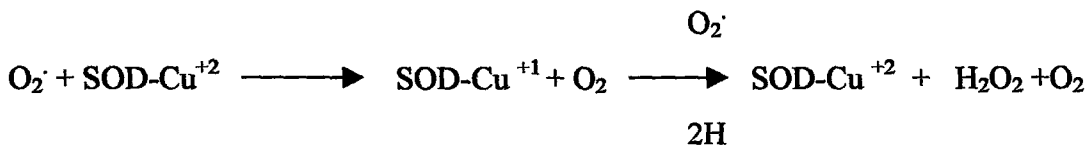
Ksantin ve hipoksantin süperoksit radikali oluşmaktadır.



Oluşan bu süperoksit radikalleri, sitokrom-c'yi indirgemektedir. Fridovich ve arkadaşları, alyuvarlardan saflaştırdıkları ve daha önceden enzim aktivitesi bilinmeyen, bakır içeren mavi protein (erythrocyuprein)'i ksantin oksidaz deney sistemine eklediklerinde, sitokrom-c 'nin indirgenmediğini görmüşlerdir. Daha sonradan, bu mavi proteinin SOD enzimi olduğunu, değişik dokularda değişik metallo enzim tiplerinin bulunduğunu (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD gibi) ve süperoksitin hidrojen peroksit dismutasyonunu sağlayarak sit-c'nin indirgenmesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (73,74).



Yukarıdaki enzimatik dismutasyon şu şekilde gerçekleşir; süperoksit anyonu önce enzimdeki argininin guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sırasında bir elektronunu  $Cu^{+2}$  'ye vererek  $Cu^{+1}$  'e dönüştürürken kendisi moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşür. Başka bir süperoksit anyonu  $Cu^{+1}$  'e verilen elektronu ve ortamdaki 2 protonu ( $H^+$ ) alarak  $Cu^{+1}$ 'i tekrar  $Cu^{+2}$  'ye dönüştürür ve hidrojen peroksit oluşur (73, 75).



Süperoksit radikalleri spontan dismutasyona uğrayabilirler. Kendiliğinden dismutasyonun hız sabiti, pH 7,4 'te:  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  'dir. Buna göre süperoksit radikalleri ortamda fazla birikmezler ve SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyon önemsiz görülebilir. Fakat şu sebeplerden dolayı enzimatik dismutasyon çok önemlidir:

1. SOD ile dismutasyonun hızı, kendiliğinden dismutasyona göre 4 kat daha yüksektir. (enzimatik dismutasyonun hız sabiti : pH 7,4 'te :  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  dir.)
2. Normal şartlarda SOD derişimi, oluşan süperoksit anyonlarının steady state derişimine göre  $10^5$  kat daha fazladır. Bu durumda iki süperoksit molekülünün birbiriyle çarpışması olasılığı, enzimle karşılaşma olasılığına göre  $10^5$  kat daha az olacaktır. Bu iki faktör göz önüne alındığında, enzimatik dismutasyonun kendiliğinden dismutasyona göre  $10^9$  kez daha hızlı olduğu görülmektedir (76).

SOD fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granulositlerden daha fazla miktarda SOD bulunur. SOD aktivitesindeki genetik yada sonradan meydana gelmiş değişiklikler ile hastalığa karşı hassasiyet ya da direncin birbiriyle ilişkili olabileceği kaydedilmiştir (43).

Antrensen, metilkolastren, benzipren fotokimyasal olarak oksijen üretir ve bunlar SOD ile önlenir. Paraquat ve streptonigrin oksijen üreterek etki eder ve bu da SOD ile önlenir. S.fecalis, E.coli ve S.cereviside de ortamdaki oksijeni arttırır ve SOD azalır. (77,78)

Kofaktör olarak içerdikleri metal iyonlarına göre başlıca üç tip SOD vardır (60,70).

1.) Cu-Zn SOD, 2.) MnSOD 3.) Fe SOD. İnsanda Cu-Zn SODve Mn SOD izoenzimleri bulunur (70).

### **BAKIR-ÇİNKO İÇEREN SOD (Cu/Zn SOD)**

Ökaryotik hücrelerde hücrenin , sitozol, nükleer membran ve mitokondrilerinin membranlar arası bölgesinde tesbit edilmiştir. Prokaryotlarda çok nadir bulunur. Birbirine eş ve 15600-16500 dalton ağırlığında iki monomerden oluşan bu dimerik enzimin mol ağırlığı 31000-33000 dalton arasındadır (78). Her bir subünitede, bir Cu atomu, bir Zn atomu , bir sülfidril (S-H) grubu, bir asetillenmiş terminal amino grubu ve zincirleri bir arada tutan disülfid bağı bulunmaktadır. Ortama merkaptoetanol konduğu zaman bu S-S bağı redüksiyona uğrayarak S-H haline gelir ve iki monomer birbirinden ayrılır (43,70).

Enzim aktivitesi için Cu mutlaka gerekli iken, enzim stabilitesini sağlamaya yarayan  $\text{Zn}^{+2}$  'nin yerine ;  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  geçebilir. Zn ve Cu aynı histidin aminoasitine bağlanır. Syanid, Zn' yi bağlayarak enzimi tersinir olarak inhibe eder(21 nolu kromozomda) (43).

Bu izomer hücrede en fazla bulunur ve SOD lar arasında en yüksek katalitik etkiyi gösterir. PH:5,5-10 arasında stabildir (43,80).

#### **MANGAN İÇEREN SOD (Mn SOD)**

1970 yılında Keele ve arkadaşları tarafından (81), E. Coli sitozolünden izole edilen bu enzimin etki mekanizması, Cu-Zn-SOD ile aynıdır. Prokaryotlardaki izomeri dimerik yapıda olup molekül ağırlığı (MA) = 36000-46000 dalton arasındadır (76, 82).

Mn-SOD, dimer başına 0.5-1 atom karşılık gelecek şekilde +3 değerlikli Mn atomu ihtiva etmektedir (81). Monomerik polipeptid zinciri daha büyüktür ve pH değeri 7,8 'in üzerine çıktıkça aktivitesi zayıflar. 6 numaralı kromozomda lokalizedir (81,75).

Paraquat, E.colide sadece Mn-SOD'un biyosentezini bozar. X irradiasyonu yöntemiyle; NaCN ilavesi Cu/Zn SOD yi azaltırken (sığırcı karaciğerinde), MnSOD'u arttırdığı (rat karaciğerinde) gözlenmiştir. X irradiasyonu Zu/Cn SOD'u etkilemezken, MnSOD'u artırır. E.coli , S.mutans, MnSOD'u bulundurur (64).

#### **DEMİR İÇEREN SOD ( Fe-SOD):**

İlk olarak E.coli'nin (prokaryotlarda) periplazmik kısmında osmotik şokla yapılan testte bulunmuştur. E-Coli'den izole edilen Mn-SOD daha iç kısımdaki (matrix) sitoplazmada bulunur. Buradan hareketle matriksteki MnSOD 'un endojen süperoksit radikallerine karşı, periplazmik bölgedeki Fe-SOD ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu görev yaptığı düşünülmektedir (70,81).

Fe-SOD izomeri de diğer izomerlerinin etki mekanizmasına benzemesine karşın, monomerik aminoasit dizilimi Mn-SOD'a benzer (79).

Fe-SOD izoenziminin içerdiği demir  $Fe^{+3}$  şeklindedir ve bir monomerinin ağırlığı Mn-SOD'a benzer olarak 19000-23000 arasındadır. Bakterilerde, yeşil alglerde Fe zengin ortamda tespit edilmiştir (64). Prokaryotlara özgüdür, ökaryotlarda çok nadirdir ve insanlarda bulunduğu dair bilgi henüz yoktur.

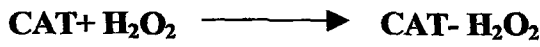
#### **2.4.1.4. KATALAZ (CAT) (E.C. 1.11.1.6)**

Katalaz enzimi, yapısında dört adet hem grubu içeren alt ünitelerden oluşmuş kompleks bir hemoproteindir. Yapısında prostetik grup olarak  $Fe^{+3}$  içeren bir protoporfirin IX ihtiva etmektedir. Her monomer, yaklaşık 6000 dalton civarında molekül ağırlığına sahiptir. CAT, sitokrom sistemi içeren tüm aerobik hücrelerde bulunur (43,83). Anerobik hücrelerden ise sadece radyasyona dirençli bakterilerde bulunduğu rapor edilmiştir (43). Enzim esas olarak peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunur. Aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir (83). Bağ

doku ise enzim aktivitesinin en düşük olduğu kısımdır (43). Olgun eritrositlerde katalazın sitoplazmada bulunduğu bilirse de, son araştırmalar eritrosit membranında da tesbit edildiği rapor edilmiştir (84).  $H_2O_2$  kaynağı olarak katalazdan başka, ksantin oksidaz, mitokondriyal ve mikrozomal elektron tranport sistemleri de vardır.

Katalazın peroksidatik ve katalitik olmak üzere iki fonksiyonu vardır. Katalazın temel fonksiyonu  $H_2O_2$ 'nin enzimatik parçalanması yanında (**katalitik aktivite**); düşük  $H_2O_2$  konsantrasyonunda, metil veya etil hidro peroksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük molekülü elektron vericilerini indirgeyebilir. (**Peroksidatik aktivite**) Lipid peroksitleri gibi büyük molekülleri indirgeyemez (83,84). Enzim bir molekül  $H_2O_2$ 'den elektron alarak onu oksitlerken kendisi redüklenir, bir diğer molekül  $H_2O_2$ 'ye e vererek onu indirgerken kendisi oksitlenerek başlangıçtaki durumuna döner (84).

**a)Katalitik aktivite:**



**b) Peroksidatik Aktivite:**



Katalazın peroksidatik aktivitesi elektron verici küçük moleküllerle gerçekteşebilmektedir.



Yukarıdaki reaksiyonlarda da görüldüğü gibi, her katalitik reaksiyon için 2  $H_2O_2$  molekülü gerekirken, peroksidatik aktivite için 1  $H_2O_2$  molekülü yeterlidir. Enzimin bu iki reaksiyondan hangisini göstereceği  $H_2O_2$ 'nin üretim hızı, oluşan biyomoleküllerin tür ve miktarlarına yani hücrenin metabolik durumuna bağlıdır (85).

### 3. MATERYAL METOD

#### 3.1. MATERYALLER:

Turgut Özal Tıp Merkezinin gelen enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji bölümüne gelen 35±20 yaşlarındaki bireyler hasta olarak alındı. Kontrol grupları için ise hepatit B yönünden negatif olan hiçbir enfeksiyonu bulunmayan, sigara ve alkol kullanmayan 35±20 yaşlarındaki sağlıklı bireyler seçildi. Antioksidan tedavi alanlar, alkol kullananlar, hepatit B'den başka enfeksiyonu bulunanlar çalışmaya alınmadı. Akut viral hepatit B (AHBV) grubuna hasteneye başvuruda 3 haftayı geçmeyen semptom süresi ve normalin en az 4-5 katı ALT-AST yüksekliği AntiHBcIgM/ HBsAg'si pozitif olan hastalar seçildi. Kronik viral hepatit B (KHBV) grubuna 6 aydan uzun süredir HBsAg pozitifliği gösteren ve hafif ALT – AST yüksekliği ile histopatolojik olarak kronik viral hepatit tanısı konmuş olgular seçildi. Yine kronik hepatit B' li olup 6 aydır haftada 3 kez 1 milyon ünite interferon alfa tedavisi alan bireyler (KHBVIFN) seçildi. Hasta ve kontrol gruplarının hepsi 30'ar kişiden oluşmaktadır.

#### 3.2. KULLANILAN ARAÇ GEREÇ VE KİMYASAL MALZEMELER:

##### 3.2.1.KİMYASAL MALZEMELER:

Histopaq-1077, çinko sülfat ( $ZnSO_4$ ), sodyum hidroksit (NaOH), glisin, bakır Sülfat ( $CuSO_4$ ), sulfanilamid, sodyum nitrit ( $NaNO_2$ ), potasyum nitrat ( $KNO_3$ ), sodyum tetra borat ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ), heparin, ksantin, ksantin oksidaz, nitrobluetetrazolium (NBT), bakır klorür ( $CuCl_2$ ), bovin serum albumin (BSA), glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR), sodyum azid ( $NaN_3$ ) sigma firmasından; sodyum karbonat ( $Na_2CO_3$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), ethylen diamine tetraacetic Acit (EDTA), amonyum sülfat ( $(NH_4)_2SO_4$ ), kloroform, etanol, sodyum klorür, potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ), NADPH, disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ), potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) merck firmasından temin edildi.  $TNF\alpha$ ,  $IL1-\beta$ ,  $IL2R$ ,  $IL6$ ,  $IL8$  kitleri ise BİO-DPC firmasından temin edilerek immulite cihazında çalışıldı. Kadmiyum granülleri (Cd) fluka firmasından alındı.

##### 3.2.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER:

Jensons sealpette marka pipet, Labinco marka vortex, Shimadzu marka spektrofotometre, shimadzu marka hassas terazi, hermler Z 383 K santrifüj cihazı, eppendorf marka 5415 c model ultra santrifüj, Clifton marka magnetik karıştırıcı, Hanna marka 8521 model dijital pH metre, Bandelin electronic marka Heinrichstrasse 3-4 D 12207 model sonificatör kullanıldı.

### 3.3. METODLAR:

#### 3.3.1. NUMUNE ALINMASI VE NUMUNELERİN HAZIRLANMASI:

**Eritrosit, Lenfosit ve Plazma numunelerinin Hazırlanması:** Hastalardan ve kontrol grubundan 10 ml heparinize kan kübital medyan venlerinden alındı. Alınan kanlar cam tüplere önce 2 ml Histopaq-1077 konarak üzerine yavaşca 45 °C açılı ile ilave edildi. Kanlar 400 x g 'de + 4 °C 30 dk santrifüj edildikten sonra üstteki plazma kısmı pastör pipeti ile ayrı bir eppendrofa alınarak - 40 °C de saklandı. Diğer taraftan alttaki mononükleer hücre tabakası histopaq tabakasının içine 0,5 cm pipet ucuyla girilerek temiz bir tüpe alındı. Eritrosit tabakasının üzerindeki buffy coat kısmı atılarak alttaki kısmın üzerine pH'sı 7 olan 10 ml PBS ilave edildi. Lenfosit tabakası üzerine de 10 ml PBS 'den ilave edilip, 250 x g 'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üzerindeki kısım atılarak alttaki kısmın üzerine, PBS ilave edilerek 2 defa daha santrifüj edildi. Eritrositler buz gibi soğuk su ile 5 kat dilüe edildikten sonra vortex ile karıştırılıp -40 °C'de çalışılncaya kadar saklandı. Lenfositler 0,5 ml PBS içinde saklandı

**Lenfositlerin çalışmaya Hazırlanması:** Lenfositleri 1968'de Boyum (86) tarafından uygulanan yöntemle diğer hücrelerden Histopaq 1077 aracılığıyla ayırdık. (30 mW /cm<sup>2</sup>, 2MHz) 30 cycle 'de 72 MS/D'de 10 sn aralıklarla 3 defa sonifikeye edildikten sonra 10000 x g de ultrasantrifüj ile santrifüj edildikten sonra üstteki kısım alınarak çalışıldı. (87,88)

#### 3.3.2. LENFOSİTLERDE PROTEİN TAYİNİ:

Lenfositlerde protein tayini için Lowry yöntemi kullanıldı. (89)

##### KULLANILAN REAKTİFLER:

**A reaktifi:** 0.5 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 1.00 g Sodyum Sitrata (Na<sub>3</sub> sitrat susuz) 100 ml distile suda çözüldü.

**B reaktifi:** 10.0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 2 g NaOH, 500 ml distile suda çözüldü.

**C reaktifi:** 50 ml B çözeltisine 1 ml A çözeltisi eklendi.

**D reaktifi:** 10 ml Folin Ciocalto reaktifine 10 ml distile su ilave edildi.

**BSA çözeltisi:** Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 10,20,30,40,50, . µg/ml 'lik çözeltileri hazırlandı.

##### DENEYİN YAPILIŞI:

Test ve standart tüplerine 490 µl, kör tüpüne 500 µl distile su kondu. 2.5 ml C reaktifi tüm tüplere ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 µl numune; standart tüplerine de

10 µl her bir standarttan ilave edildi. İyice vortexlendikten sonra karanlıkta 25 °C 'de 30 dk bekletildikten sonra, karıştırarak tüm tüplere 250 µl D reaktifi eklendi. Spektrofotometrede 650 nm'de okuma yapıldı.

#### **PROTEİN MİKTAR HESAPLAMASI:**

Standart BSA çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak bulunan değer, standart hacmi / numune hacmi faktör olarak alındı ve bu faktör ile çarpıldı.

#### **3.3.3. HEMOGLOBİN TAYİNİ:**

Daha önce hazırlanan 1/50 sulandırılmış hemolizatu 5000 x g 'de 15 dk santrifüj ettikten sonra daha önceden 1-18 g/dl arasındaki konsantrasyonda hazırlanan standart grafiğine göre OLYMPUS-AU 600 cihazında Drabkins solusyonu ile çalışıldı.

#### **3.3.4. KATALAZ TAYİNİ:**

Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene dönüştürür.



Bu çalışmada Aebi yöntemi kullanıldı.(90) Prensip olarak bu metotta ortamdaki hidrojen peroksitin CAT tarafından parçalanması ile 240 nm 'de meydana gelen absorbans azalmasının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Standart şartlarda deney ortamına eklenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin birim zamandaki absorbans azalması hızı, katalaz aktivitesini belirler.

#### **A-) KULLANILAN REAKTİFLER:**

**1-Fosfat Tamponu: (pH=7, 50 mM)** 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 'de 413 ml alınarak, üzerine 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ilave edilerek hazırlandı.

**2-Hidrojen Peroksit Çözeltisinin Hazırlanması:** % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden; hazırlanan fosfat tamponunun 100 ml' sine optik dansitesi (240nm'de) 0.5 olana kadar ilave edilerek hazırlanır.

#### **B-) DENEYİN YAPILIŞI:**

Eritrosit hemolizatını distile su ile 100 kat dilüe ettikten sonra, kör küvetine 2.99 ml fosfat Tamponu, 10 µl hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilip 240 nm'de okundu. Numune küvetine ise 2.99 ml hidrojen peroksit çözeltisi 10 µl numune konar konmaz 240 nm'de hemen absorbans azalması 15 sn aralıklarla kaydedildi (91).



### C-) KATALAZ AKTİVİTESİNİN HESAPLANMASI:

$$K = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{A_1}{A_2} = \frac{2.3}{\Delta t} \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

$\Delta t = 60$  sn olduğundan;

$$K = \frac{2.3}{60} \times \log \frac{A_1}{A_2} = 0.0383 \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

100 kat dilüe olmuş numune kullandığımız için ve formül 1 ml 'ye göre düzenlendiğinden bizde 10  $\mu$ l numune kullandığımızdan  $100 \times 100 = 10000$  ile çarpmalıyız:

$$K = 0.0383 \times \log \frac{A_1}{A_2} \times 10000$$

K' yı ml'deki Hemoglobine böldüğümüzde;

$$K = \frac{383 \times \log \frac{A_1}{A_2}}{\text{g Hb/ml}}$$

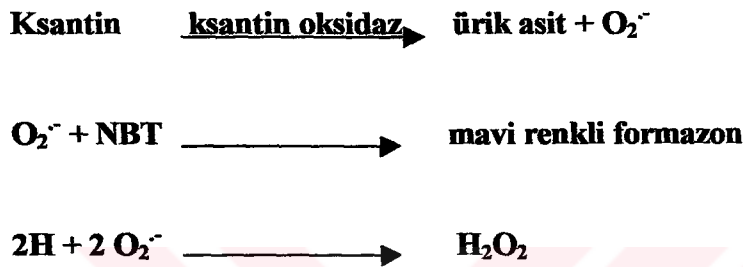
$A_1$  = ilk okunan absorbans

$A_2$  = son okunan absorbans

Lenfosit içi katalaz aktivitesi olmadığından lenfosit içi çalışma yapılamadı.

### 3.3.5. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ:

Bu metod, Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) tarafından ksantin–ksantin oksidaz yoluyla üretilen süperoksit radikallerinin,  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmesi ve nitroblue tetrazolium'u indirgemesi esasıyla çalışan bir methoddur. İndirgenen NBT 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazana dönüşür (92). SOD enzimi de iki süperoksiti dismute ederek hidrojen peroksit oluşturmaktadır. Böylece belirli bir miktar NBT'nin bulunduğu deney ortamında, süperoksidin miktarı standardize edildiği zaman ortamdaki SOD enziminin aktivitesiyle NBT ters orantılı olarak mavi renk oluşturur. Buradan da SOD ile NBT 'nin oluşan süperoksitle reaksiyona girdiğini söyleyebiliriz.



#### KULLANILAN REAKTİFLER:

- 1-) Assay Reaktifi : 200 ml 0.3 mMol/L Ksantin,  
100 ml 0.6 mMol/L  $Na_2EDTA$   
100 ml 150  $\mu\text{mol/L}$  NBT  
60 ml 400 mMol/L  $Na_2CO_3$   
30 ml 1g/L BSA

Bu çözeltilerin hepsi karıştırılarak koyu renkli bir şişede + 4 °C 'de saklandı

- 2-) Ksantin Oksidaz: 167 Ü/L (soğuk 2M 'lik  $(NH_4)_2SO_4$  ile 1ml'ye tamamlandı.
- 3-)  $CuCl_2$  : 0.8 mmol/L (100 ml )
- 4-)  $(NH_4)_2SO_4$  : 2M (10 ml)
- 5-) Kloroform-Etanol çözeltisi (C/E): 3 hacim kloroform 5 hacim etanol ile karıştırıldı.

#### B-) DENEYİN YAPILIŞI:

Eritrosit numuneleri 100 kat distile su ile, lenfosit numuneleri de PBS ile 2 kat dilüe edildikten sonra 3/5 oranında hazırlanan kloroform/etanol çözeltisinden eşit hacimde konarak +4 °C'de 4000 x g 'de 30 dk santrifüj edildi. Daha sonra üsteki süpernatandan

alınarak çalışmaya başlandı. K r tüpüne ve test tüplerine 2.45 ml Assay reaktifi; 0.5 ml numune test tüpüne, 0.5 ml distile su k r tüpüne; 50  l ksantin oksidaz ilave edildi. 20 dk 25  C bekletildikten sonra tüm tüplerin üzerine 1 ml CuCl<sub>2</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 560 nm'de önce spektrofotometre sifira ayarlanak önce k r sonra tüm tüpler sirasıyla okundu.

### C-) SOD AKTİVİTESİNİN HESAPLANMASI:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Absorbans k r (Ak)} - \text{Absorbans Numune (An)}}{\text{Absorbans K r (Ak)}} \times 100$$

1  nite SOD; NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir. Buna göre;

$$\ddot{U} = \frac{\text{Ak} - \text{An}}{\text{Ak}} \times \% 100 = \frac{\text{Ak} - \text{An}}{\text{Ak}} \times 2$$

%50 inhibisyon

1 ml'deki ünite miktarı; eritrosit için 0,5 ml, lenfosit için 0,1 ml n numune kullandığımızdan ve eritrositi 100 kat önce sonra da 2 kat C/E ile sulandırdığımızdan 200 ile; lenfosit de önce 2 sonra C/E ile 2 kat sulandırdığımızdan 4 ile çarpmamız gerekir.

$$\ddot{U} = \frac{\text{Ak} - \text{An}}{\text{Ak}} \times 2 \times \frac{1}{0.5} \times 200 \text{ (eritrosit için)}$$

$$\ddot{U} = \frac{\text{Ak} - \text{An}}{\text{Ak}} \times 2 \times \frac{1}{0.1} \times 4 \text{ (lenfosit için)}$$

$$\dot{U} = \frac{\text{Ak-An}}{\text{Ak}} \times 800 \text{ (eritrosit için)}$$

Ak

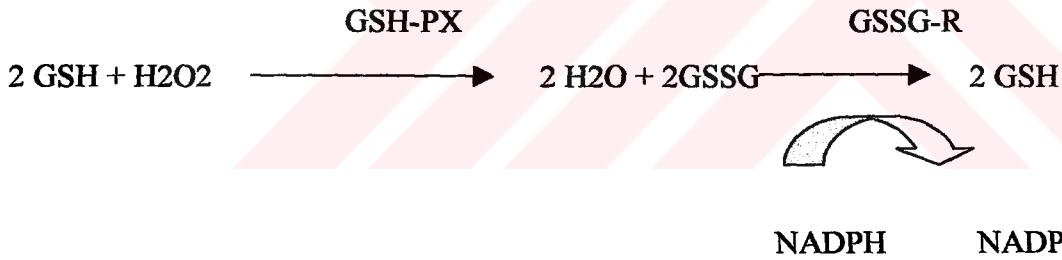
$$\dot{U} = \frac{\text{Ak-An}}{\text{Ak}} \times 80 \text{ (lenfosit için)}$$

Ak

Çıkan sonucu eritrosit için gram Hb ve mg proteine bölerek spesifik aktiviteyi bulmuş olduk.

### 3.3.6. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX) ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ:

GSH-PX, in vitro olarak redükte glutatyonun oksidasyonu aracılığıyla hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Oluşan okside glutatyon tekrar redükte formuna dönüşmesi için glutatyon redüktaz ve redükte NADP (NADPH) 'in okside formuna dönüşmesi gerekir. Bu, ancak ortamda bulunan NADPH varlığında gerçekleşir. Böylece ortamda azalan NADPH'in miktarı bize GSH\_PX 'in aktivitesini gösterir.



NADPH'deki 340 nm'de maksimum absorbans verdiği için, GSSG-R aktivitesi devam ettikçe NADPH azalma miktarı ile ortamdaki GSH-PX aktivitesini hesaplayabiliriz. (93)

#### A-)KULLANILAN REAKTİFLER:

1-)EDTA'lı fosfat tamponu: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 L hazırlayıp içerisine 5 mm 'lik EDTA ilave edildi.

2-)NaN<sub>3</sub> (Sodyum azid) : 1 mM

3-)GSH (Redükte Glutatyon) : 2 mM

4-)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 0.25 mM

5-) NADPH : 0.2 mM

6-)GSSG Redüktaz :1.2 U/ml

**B-) DENEYİN YAPILIŞI:**

Eritrosit numuneleri için 100 kat dilusyonlu numuneler, lenfosit numuneleri için 5 kat dilüe numuneler kullanıldı. Kör tüpüne 2.67 ml EDTA'lı PBS, test tüplerine 2.65 EDTA'lı PBS, bütün tüplere 100 µl GSH, 100 µl NADPH, 10 µl GSH redüktaz, 10 µl NaN<sub>3</sub>, ilave edildikten sonra test tüplerine 20 µl numune eklenip 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometre 340 nm'de distile su ile sıfırlanıp, süre sonunda her tüpe 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilip reaksiyon başlatılarak hemen 3 dk süresince absorbans azalması takip edilecek şekilde okunmaya başlandı.

**C-GSH-PX ENZİM AKTİVİTESİNİN HESAPLANMASI:**

1 Ünite GSH-PX: 1 dakikada okside olan NADPH'in µmol cinsinden miktarıdır.

$$\dot{U}/L(\mu\text{mol}/\text{dk}/L) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{E \times V_s \times L}$$

E = NADPH'in ekstinction sabiti (6.22x10<sup>3</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

V<sub>t</sub> = Total reaksiyon zamanı (3 dk)

V<sub>s</sub> = Total reaksiyon içindeki numune volümü(0.02 ml)

L = Küvet çapı

ΔA/t = dakikadaki absorbans değişimi

10<sup>6</sup> = molün mikromole çevrilmesi

$$\dot{U}/L = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{6.22 \times 10^3 \times 0.02 \times 1} = \Delta A/t \times \frac{3 \times 10^6}{124.4}$$

Ailk-Ason

$$\dot{U}/L = \frac{\text{Ailk-Ason}}{3} \times \text{sulandırma oranı} \times 24115$$

Spesifik aktivite için ise bulunan sonuçlar eritrosit numuneleri için g Hb'ne böylece sonuç Ü/gHb, olurken lenfosit için bulunan sonuçlar da mg/proteine bölündü, böylece sonuç Ü/mgprotein olarak bulundu.

### 3.3.7. NİTRAT VE NİTRİT ÖLÇÜMÜ:

Nitrik oksit ( $\text{NO}$ ), üretildikten sonra, 2-30 sn gibi çok kısa serede nitrit ( $\text{NO}_2$ ) ve daha sonra da nitrat ( $\text{NO}_3$ )'a oksitlenir. Nitrat formu, nitrik oksit türevlerinin en kararlı yapısıdır. Nitrik oksit stabil yapıda olmaması nedeniyle direkt ölçmek çok zordur. Bu nedenle nitratı kadmiyum ile nitrite indirgenerek ölçüm yapıldı (94).

#### KULLANILAN REAKTİFLER:

- 1-) Kadmiyum granülleri : 0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.
- 2-) Glisin –NaOH buffer: 7.5 g glisin bir miktar distile suda çözüldü. 2 mol/L NaOH çözeltisi ile pH'sı 9.7'ye ayarlandı. Bu çözelti 1 ay 0-8 °C 'de stabildir.
- 3-) Sülfanilamid: 5 g sülfanilamid 3 mol/L 500 ml sıcak HCl içinde çözülür ve daha sonra soğumaya bırakılır. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.
- 4-) N-Naphthylethylene diamine (NNDA) : 50 mg NNDA 250 ml distile su içinde çözüldü 2 ay 0-8 °C 'de stabildir.
- 5-) Çinko Sülfat ( $\text{ZnSO}_4$ ): 75 mmol/L; 10.8 mg alınıp 500 ml'ye tamamlandı.
- 6-) Bakır Sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) : 5 mmol/L; 250 mg alınıp 200 ml'ye tamamlandı.
- 8-) Sodyum Hidroksit (NaOH): 55 mmol/L; 1.1g alınıp 500 ml 'ye tamamlandı.
- 7-) Standartlar:  $\text{NaNO}_2$  standardı 10 mmol/L 'lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlandı. ( 69 mg  $\text{NaNO}_2$ , 380 mg borat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) 100 ml içinde çözülür.)  
 $\text{KNO}_3$  standardı; 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mmol 'lik 100 ml sodyum tetra borat içinde çözüldü.

#### DENEYİN YAPILIŞI:

**Deproteinizasyon:** Test tüpüne 0.5 ml numune, kör tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml  $\text{ZnSO}_4$ , 2.5 ml NaOH ilave edilip 10 dk oda ısısında beklettikten sonra 4000 x g 'de 20 dk santrifüj edildi.

**Kadmiyum granüllerinin Aktivasyonu:** Granüller 3 defa distile su ile yıkandı. 1-2 dk içinde  $\text{CuSO}_4$  içinde çalkalayarak bekletilip, 3 defa da Glisin-NaOH ile yıkayıp 10 dk içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

**Nitrat ölçümü:**  $\text{KNO}_3$  'ün 10 milimolar'lik çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200  $\mu\text{mol}$ 'lik seri dilüsyonlar hazırlandı. Ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı.

1 ml glisin-NaOH buffer tüm tüplere kondu. 1'er ml deproteinize numunelerden ve standartlardan alındı. 2.5 gr tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan

tüm tüplerin üzerine kondu. 90 dk oda ısında karıştırıcıda karıştırılarak beklendi. Süre sonunda Nitrit ölçümü için bu tüplerden 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA ilave edildi. Karıştırıldı ve 45 dk beklendikten sonra 545 nm 'de okuma yapıldı.

**Direkt nitrit ölçümü:** NaNO<sub>2</sub> standartlarını 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 µmol'lik seri dilüsyonlar hazırlandı. Ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2 'şer ml alınarak ayrı tüplere kondu. Üzerine 1 ml sulfanilamid ve 1 ml NNDA eklendi. 45 dk sonra 545 nm'de okuma yapıldı.

#### **Nitrat Aktivitesinin Hesaplanması:**

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerlerini çıkardıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpıp yine nitrat standartından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç µmol/L olarak hesaplanmış oldu.

**SİTOKİNLERİN TAYİNİ:** Sitokin ölçümleri, BİODPC firmasının chemiluminescent enzim immunometrik yöntemiyle(Immulate® Diagnostic Product Co., CA, USA) IMMULİTE cihazında; İL-1β için LKL11, İL-6 için LK6P1, IL-6 için LK6P1, IL-8 için LK8P1 VE IL-2R için LKIP1 TNF-α için LKNF1 lot numaralı ticari kitleri kullanıldı.

#### 4. BULGULAR:

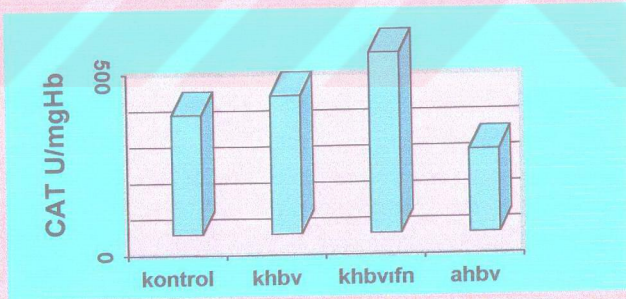
##### 4.1. ERİTROSİT KATALAZ AKTİVİTE SONUÇLARI:

Eritrosit katalaz aktivitesi tablo 5' te ve şekil:1'de görüldüğü gibi akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre % 31.11 oranında azalma varken kronik hepatit B 'li grupta kontrole göre % 15.84 oranında bir artma olduğu, Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  tedavisi alan grupta kontrole göre % 50.78, KHBV'li gruba göre % 30.15 oranında artma olduğu gözlemlendi.

F Değeri: 2,2865 p>0.05

**Tablo:5 Kontrol ile khbv, khbv, khbvİfn gruplarının eritrosit katalaz aktivitelerinin ortalama  $\pm$ Standart sapmaları**

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (U/mgHb)	Kontrole Göre %
KHBV (Grup:1)	383.97 $\pm$ 70.47	15.84
KHBVİFN (Grup:2)	499.76 $\pm$ 119.40	50.78
AHBV (Grup:3)	229.06 $\pm$ 6.94	-31.11
KONTROL (Grup:4)	331.44 $\pm$ 54.06	0



Şekil:1 Kontrol ile khbv, khbv, khbvİfn gruplarının eritrosit katalaz aktivitelerinin ortalama  $\pm$ Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.

**Khbv;** kronik hepatit B'li grup, **ahbv;** akut hepatit B'li grup, **khbvİfn;** kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup



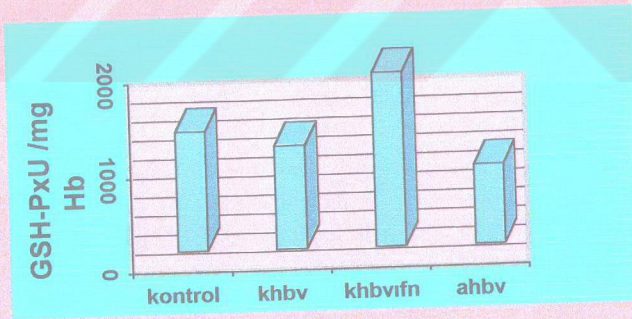
#### 4.2. ERİTROSİT GSH-PX AKTİVİTE SONUÇLARI:

Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX) aktivitesi tablo 6 ve şekil 2' de görülmektedir. Tablo ve grafikten anlaşılacağı üzere akut hepatit B (AİHBV)'li grupta kontrole göre % 33.58 azalma varken, kronik hepatit B(KHBV) 'li grupta kontrole göre % 13.34 oranında azalma olduğu, Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrole göre % 45.45 artma, KHBV'li gruba göre % 67 oranında artma olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. ( $P < 0.01$ ) Ayrıca gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda KHBV 'li grup ile KHBV+IFN'li grup arasında anlamlı fark gözlemlendi.

**Tablo: 6 Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının eritrosit GSH-Px**

**aktivitelerininin ortalama  $\pm$ Standart sapmaları ve % ifadeleri.** ( $P < 0.05$  f değeri:3.8565)

	Ortalama $\pm$ Standart.Hata U/MgHb	Kontrole Göre %
KHBV (Grup:1)	1094.62 $\pm$ 21.91	-13.34
KHBVIFN (Grup:2)	1837.29 $\pm$ 429.34	45.45
AHBV (Grup:3)	838.94 $\pm$ 17.07	-33.58
KONTROL (Grup:4)	1263.15 $\pm$ 29.45	0



**Şekil:2 Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının eritrosit GSH-Px aktivitelerininin ortalama  $\pm$ Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.**

**Khbv;** kronik hepatit B'li grup, **ahbv;** akut hepatit B'li grup, **khbvifn;** kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup

### 4.3. ERİTROSİT SOD AKTİVİTE SONUÇLARI:

Eritrosit Süperoksit –Dismutaz (SOD) aktivitesi tablo 7 ve şekil 3’ de görülmektedir. Eğer tablo 7 ve grafik 3 incelenecek olursa akut hepatit B (AHBV)’li grupta kontrole göre % 6,5 oranında azalma varken, kronik hepatit B (KHBV) ‘li grupta kontrole göre % 49,2 oranında artma olduğu ve Kronik hepatit B’li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrole göre% 51,41 oranında, KHBV’li gruba göre 1,5 oranında bir artış olduğu gözlemlendi. ( $p>0.05$ )

**Tablo: 7 Kontrol ile khbv, khbv, khbvİfn gruplarının eritrosit SOD aktivitelerinin ortalama  $\pm$ Standart sapmaları ve % ifadeleri. ( $P>0.05$  f değeri:1,31)**

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (U/gHb)	Kontrole Göre %
KHBV (Grup:1)	4833.07 $\pm$ 1014.1	49.2
KHBVİFN (Grup:2)	4903.18 $\pm$ 1193.73	51.41
AHBV (Grup:3)	3045.46 $\pm$ 50.89	-6.5
KONTROL (Grup:4)	3238.31 $\pm$ 760.82	0



**Şekil:3 Kontrol ile khbv, khbv, khbvİfn gruplarının eritrosit SOD aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.**

**Khbv;** kronik hepatit B’li grup, **ahbv:** akut hepatit B’li grup, **khbvİfn;** kronik hepatit B’li olup interferon tedavisi alan grup

#### 4.4. LENFOSİT GSH-PX AKTİVİTESİ

Lenfosit içi GSH-Px aktivitesi tablo 8 ve şekil 4' de görüldüğü gibi akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre % 17.3 oranında azalma varken, kronik hepatit B (KHBV) 'li grupta % 35.09 oranında artma olduğu ve Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrole göre % 5,1, KHBV'li gruba göre % 22 oranında azalma olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. ( $p < 0.05$ ) Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda KHBV'li grupla AHBV 'li grup, AHBV ile kontrol grubu, KHBV ile kontrol grubu, KHBV ile KHBV-IFN grubu arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu tesbit edilmiştir.

**Tablo=8 Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının lenfosit GSH-Px aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmaları ve % ifadeleri. ( $p < 0.0001$  f değeri: 66,03)**

	Ortalama $\pm$ Standart.Hata	Kontrole Göre %
KHBV* (Grup:1)	741,00 $\pm$ 19.09	35.09
KHBVIFN*(Grup:2)	576,28 $\pm$ 17.46	5,1
AHBV* (Grup:3)	453,61 $\pm$ 11.08	-17.3
KONTROL*(Grup:4)	548,50 $\pm$ 8.57	0

\* Grup 1 ile 4 ,grup 1 ile 2,grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark var



**Şekil: 4 Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının lenfosit GSH-Px aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.**

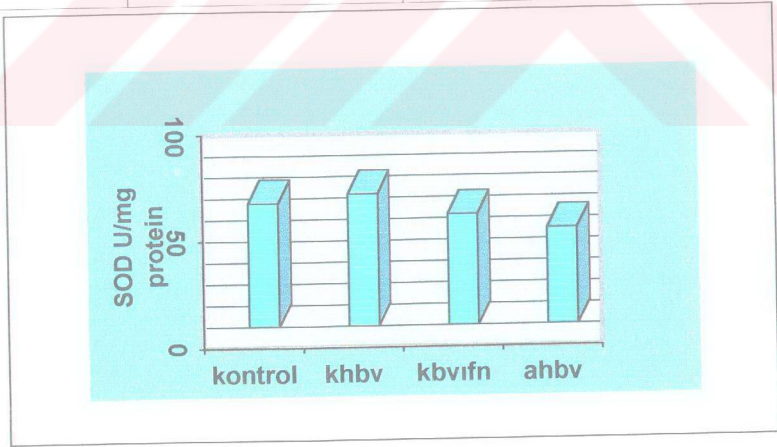
**Khbv:** kronik hepatit B'li grup, **ahbv:** akut hepatit B'li grup, **khbvifn:** kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup

#### 4.5. LENFOSİT SOD AKTİVİTESİ

Lenfosit içi SOD aktivitesindeki farklılıklar tablo 9 ve şekil 5' de özetlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar karşılaştırıldığında akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre % 22.9 oranında azalma varken, kronik hepatit B (KHBV) 'li grupta % 6.5 oranında artma olduğu ve Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrol göre % 10.8 oranında, KHBV'li gruba göre % 16 oranında azalmış olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. ( $p < 0.05$ ) olarak bulundu. Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda KHBV'li grupla AHBV 'li grup, AHBV ile Kontrol grubu, KHBV\_IFN ile kontrol grubu, KHBV ile KHBV-IFN grubu arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır.

**Tablo:9** Kontrol ile khbv, khbv, khbvIfn gruplarının lenfosit SOD aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmaları ve % ifadeleri. f değeri =12.91  $P < 0.0001$

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma (U/mg protein)	Kontrole Göre %
KHBV* (Grup 1)	62.70 $\pm$ 2.6	6.5
KHBVIFN*(Grup 2)	52.45 $\pm$ 1.4	10.8
AHBV* (Grup 3)	45.37 $\pm$ 2.51	-22.9
KONTROL*(Grup4)	58.85 $\pm$ 1.46	0



**Şekil:5** Kontrol ile khbv, khbv, khbvIfn gruplarının lenfosit SOD aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmalarının grafiklendirmesi.

**Khbv**; kronik hepatit B'li grup, **ahbv**; akut hepatit B'li grup, **khbvifn**; kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup

#### 4.6. LENFOSİT NİTRAT AKTİVİTESİ

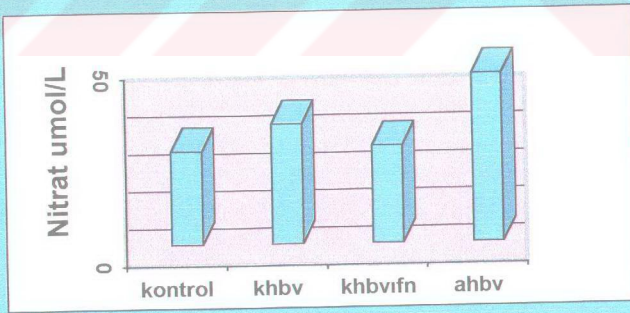
Lenfosit içi NO aktivitesindeki değişiklikler tablo 10 ve şekil 6' da aşağıda görülmektedir. AHBV'li grupta kontrole göre % 76 artıma varken, kronik hepatit B (KHBV) 'li grupta % 25.47 artıma ve kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrole göre % 4.79 'lük bir artış olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. ( $p < 0.001$ ) Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda KHBV'li grupla AHBV 'li grup, AHBV ile Kontrol grubu, KHBV ile Kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi.

**Tablo:10** Kontrol ile khbv, khbv, khbvIfn gruplarının lenfosit NO aktivitelerinin ortalama  $\pm$  standart sapmaları ve % ifadeleri.

	Ortalama $\pm$ Standart.Hata ( $\mu\text{mol/L}$ )	Kontrole Göre %
KHBV* (Grup 1)	32.16 $\pm$ 2.56	25.47
KHBVIFN (Grup 2)	26.86 $\pm$ 1.33	4.79
AHBV* (Grup 3)	45.09 $\pm$ 2.57	75.9
KONTROL*(Grup4)	25.63 $\pm$ 1.06	0

$P < 0,0001$  F DEĞERİ=19,63

\*=grup 1 ile 4 ,grup 3 ile 4 arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulundu.



şekil 6: Kontrol ile khbv, khbv, khbvIfn gruplarının lenfosit SOD aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.

**Khbv**; kronik hepatit B'li grup, **ahbv**; akut hepatit B'li grup, **khbvifn**; kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup

#### 4.7. PLAZMA INTERLEUKİN 1- $\beta$ DÜZEYİ:

Tablo:11 'de görüldüğü gibi sadece AHBV'li grupta bir artış olduğu ve diğer gruplarda değerler  $<5$  olduğundan istatistiki olarak AHBV 'li grupla diğer gruplar arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu gözlemlendi.

**Tablo:11 Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının plazma IL1- $\beta$  düzeylerinin ortalama  $\pm$  standart sapmaları ve % ifadeleri.**

	Ortalama $\pm$ standart Sapma (pg/ml)
KHBV (Grup 1)	$<5$
KHBVIFN (Grup 2)	$<5$
AHBV* (Grup 3)	6.9
KONTROL*(Grup4)	$<5$

$P < 0,0001$  F DEĞERİ=1124.00

\*grup 3 ile 4 arasında anlamlı bir fark bulundu.

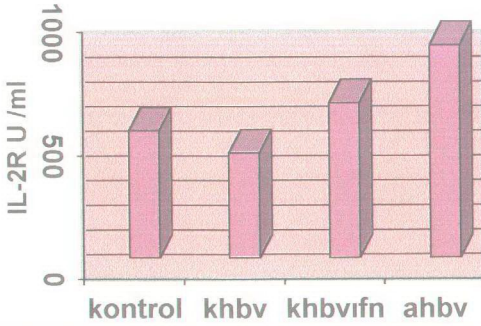
#### 4.8. PLAZMA INTERLEUKİN 2-R DÜZEYİ:

Tablo:12 ve şekil 7 'da görüldüğü gibi, AHBV'li grupta kontrole göre % 66.9'luk bir artış varken, KHBV 'li grupta % 17.4 oranında azalma olduğu ve KHBV-IFN grubunda kontrole göre % 21.7 oranında, KHBV'li gruba göre % 47 oranında artış olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi. ( $P < 0.0001$ ) Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda KHBV'li grupla AHBV'li grup, KHBV ile KHBV-IFN arasında, AHBV ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark gözlemlendi.

**Tablo 12: Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının plazma IL 2R düzeylerinin ortalama  $\pm$  standart sapmaları ve % ifadeleri. ( $P < 0,0001$  F DEĞERİ=35)**

	Ortalama $\pm$ Standart sapma (U/mL)	Kontrole göre %
KHBV* (Grup 1)	425,50 $\pm$ 193,14	-17,4
KHBVIFN (Grup 2)	627,56 $\pm$ 270,88	21.7
AHBV* (Grup 3)	860,13 $\pm$ 28,49	66.9
KONTROL*(Grup4)	515,20 $\pm$ 87,42	0

\*Grup 1 ile 3, grup 1 ile 2 grup 2 ile 4 arasında anlamlı fark gözlemlendi.



Şekil 7: Kontrol ile khbv, khbv, khbvıfn gruplarının IL-2R aktivitesinin ortalama  $\pm$  Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.

**Khbv:** kronik hepatit B'li grup, **ahbv:** akut hepatit B'li grup, **khbvıfn:** kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup

#### 4.9. PLAZMA İÇİ INTERLÖKİN 6 AKTİVİTESİ

Plazma IL-6 seviyeleri tablo:13'te görüldüğü gibi AHBV'li grupta artış gözlenirken, diğer gruplarda değerler  $<5$  olarak bulundu. Gruplar arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu gözlemlendi. ( $p < 0.001$ ) Gruplar arasında ikili karşılaştırmada, AHBV'li grupla kontrol grubu arasında istatistiki olarak fark gözlemlendi.

**Tablo:13** Kontrol ile khbv, khbv, khbvıfn gruplarının plazma IL 6 düzeylerinin ortalama  $\pm$  standart sapmaları ve % ifadeleri.

	Ortalama $\pm$ standart sapma (pg/mL)
KHBV (Grup 1)	$<5$
KHBVİFN (Grup 2)	$<5$
AHBV* (Grup 3)	$6,63 \pm 1,93$
KONTROL*(Grup4)	$<5$

$P < 0,0001$  F DEĞERİ = 41,54

\*=grup 3 ile 4 arasında anlamlı bir fark bulundu

#### 4.10. PLAZMA İÇİ INTERLEUKİN-8 AKTİVİTESİ

Plazma içi IL-8 aktiviteleri tablo:14'te görülmektedir. Tablodan da anlaşılacağı üzere, AHBV'li grupta kontrole göre % 372 oranında artış olduğu görülmektedir.KHBV'li grupta kontrole göre % 28 oranında artış olduğu ve KHBV\_IFN'li grupta KHBV'li gruba göre %30 azalma yani kontrole yaklaşmış olduğu görülmektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi.( $p<0.001$ ) Yine gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada KHBV grubu ile KHBV-IFN arasında, KHBV ile kontrol grubu, KHBV ile AHBV grubu, AHBV ile kontrol grubu arasında, anlamlı fark gözlemlendi

**Tablo 14: Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının plazma IL 8 düzeylerinin ortalama ± standart sapmaları ve % ifadeleri. ( $P<0,0001$  F DEĞERİ=95.95)**

	Ortalama ± Standart sapma (pg/ml)	Kontrole göre %
KHBV* (Grup 1)	5.12±2.87	28
KHBVIFN (Grup 2)	3.59 ± 3.91	-10.25
AHBV* (Grup 3)	18,89 ± 6.64	372
KONTROL*(Grup4)	4	0

\*=grup 1 ile 3 .grup 3 ile 4, grup 2 ile 3 arasında anlamlı bir korelasyon bulundu

#### 4.11. PLAZMA TNF- $\alpha$ AKTİVİTESİ

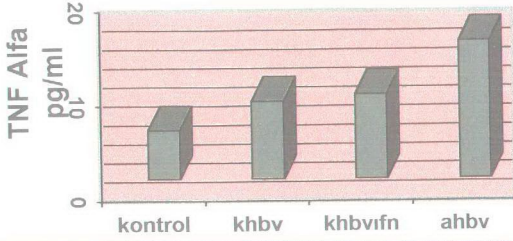
Plazma TNF-  $\alpha$  aktivitesi, AHBV'li grupta kontrole göre % 181.5 oldukça yüksek, KHBV'li grupta % 59.09 oranında kontrolden fazla, KHBVIFN grubunda kontrole göre % 72.8 artmış, KHBVIFN grubunda KHBV grubuna göre % 8.6 oranında azalmış olduğu tablo:15 ve şekil 8'den de görülmektedir. Grupların ikili karşılaştırılmasında ise KHBV ile AHBV arasında, KHBV ile Kontrol arasında, AHBV ile kontrol arasında anlamlı bir fark gözlemlendi. ( $p<0.001$ )

**Tablo 15: Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının plazma IL 8 düzeylerinin ortalama ± standart sapmaları ve % ifadeleri.**

	Ortalama ± SD	Kontrole göre %
KHBV* (Grup 1)	8.19 ± 2.71	59.09
KHBVIFN (Grup 2)	8,9 ± 1,9	72.8
AHBV* (Grup 3)	14,5 ± 1,87	181.5
KONTROL*(Grup4)	5,15 ± 87,42	0

\* grup 1 ile 4, grup 2 ile 4, grup 1 ile 3 arasında anlamlı bir fark gözlemlendi.





Şekil 8: Kontrol ile khbv, khbv, khbvifn gruplarının TNF  $\alpha$  aktivitelerinin ortalama  $\pm$  Standart sapmalarının grafiklendirilmesi.

**Khbv**; kronik hepatit B'li grup, **ahbv**; akut hepatit B'li grup, **khbvifn**; kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grup

## TARTIŞMA

Serbest radikallerin karaciğer hasarının ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli olduğu bilinmektedir (36). Bunların arasında viral hepatitler (95,45) , Wilson hastalığı (42,95), hemokromatozis (95), paretamol zehirlenmesi gibi ilaçların neden olduğu karaciğer hasarı, transplantasyon sonrası iskemi-reperfüzyon hasarı (96) sayılabilir.

Çalışmamızda lenfosit içi NO düzeylerinde, akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre % 75.9 artma varken, kronik hepatit B (KHBV) 'li grupta da kontrole göre % 25.47 artma olduğu gözlemlendi. Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta KHBV'li gruba göre % 18 azalma ile kontrole göre % 4.79 'luk bir artış olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark vardı ( $p < 0.001$ ). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda KHBV'li grupla AHBV 'li grup, AHBV ile kontrol grubu, KHBV ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. Bu bulgular Liu ve arkadaşlarının hepatit B virusunda NO sentezinin arttığı hipotezini (107), yine Amaro ve arkadaşlarının NO üretiminin HBV enfeksiyonunda TNF alfa aracılığıyla arttırdığı hipotezini (120) desteklemektedir. Guidotti ve arkadaşlarının NO üretiminin IFN-  $\gamma$  aracılığıyla, HBV replikasyonunun inhibe edildiği fakat IFN- $\alpha$  /  $\beta$  aracılığıyla bu inhibisyonun gerçekleşmediği görüşünü desteklememektedir. Çünkü bizim çalışmamızda kronik hepatit B'li olup IFN- $\alpha$  2b tedavisi alan grupta da NO sentezinin inhibe edildiği gözlemlenmiştir. NO artışı, HBV aracılığıyla hepatik İNOS'un transaktivasyonu ve bir kaç patofizyolojik olaylar sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Bunlardan ilki, NO'un süperoksitle reaksiyona girmesi ile peroksinitrit oluşarak, lipid ve proteinler oksidize olarak hücrel hasara yol açar. Fakat hala NO 'un doku hasarını indüklediği mi yoksa, hepatoprotektif olarak mı rol oynadığı açık değildir. Diğer yandan NO 'un hepatosit protein sentezini hücre canlılığını etkilemeden inhibe etmesi sözkonusudur. Bu şekilde HBV'nin indüklediği NO sentezi viral protein sentezinde azalmaya neden olur. Çünkü HBV yüzey ve kor proteinlerine karşı sitotoksik T lenfositler HBV ile enfekte hepatositlerin temizlenmesinde önemli bir rol oynar. Enfekte hepatositlerde antijen salınımının önlenmeye çalışılması bazı antijen spesifik bölgelerin yok olmasıyla enfeksiyonun kronikleşmesine neden olur. Ayrıca NO, hepatositlerin redoks durumunu değiştirir. Daha önceden de belirtildiği gibi HBVgen salınımı ve replikasyonu, oksidatif stres aracılığıyla bozulmaya çalışılır ki böylece bu mekanizmayla viral enfeksiyonun durdurulmaya çalışılmasıyla, immun sistem tarafından virusun tanınmasını engellemeye neden olur. Bu hipotez henüz açıklığa kavuşmamıştır. Yine bilindiği gibi Hepatit B virusu hepadna viridae ailesinin, nonsitopatik zarflı akut ve kronik karaciğer hastalığı yapan ve enfeksiyon kronikleştikçe

hepatosellüler karsinomaya yol açan bir virustur. HBV genomu 3.2 kb uzunluğunda, sirküler yapıda kısmen çift sarmallı DNA molekülüdür. HBV DNAsı 4 değişik protein kodlayan (open reading frames:ORF) S, C, X,P olarak adlandırılan nükleik asit dizisine sahiptir. X proteini, ORFX 'in aktive ettiği HBV'nin transkripsiyonu ve diğer viral ve hücrel promotörler ile kodlanır. Ayrıca pX, diğer transkripsiyon faktörleri arasında nükleer faktör - $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ -B), gen promotörlerini bağlayıcı bölgeleri içerir. İNOS makrofaj ve hepatositlerde bulunduğundan TNF- alfa, IL1 -Beta, interferon gamma ve endotoksinler tarafından salınır. Woodchuck hepatitinde (Hepadna virus ailesinde) NO üretiminin arttığı ve DNA hasar verici ajan olan N- nitrosodimetilamin salınımının arttığı gözlenmiştir. NO üretiminin artmasının sebebi hala açıklanamamıştır. Son yapılan bir çalışmada pX salınımı yapan plazmidi ile transenfekte olan hepatoma hücrelerinde İNOS mRNA seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir. İnsan hepatik İNOS promotörü, NF- $\kappa$ -B için fonksiyonel bağlanma bölgeleri içerdiği ve HBV pX proteini de bu promotörü transaktive ettiği hipotezide sunulmuştur. Amaro ve arkadaşları HBV enfeksiyonunda NO üretiminin arttığı ve pX proteinin, NF- $\kappa$ -B'nin indüksiyonuyla, İNOS promotörlerini TNF alfa aracılığıyla artırdığını öne sürmüşlerdir (120).

Guidotti ve ark. (114)'nın İNOS tarafından karaciğerde sentezlenen nitrik oksit HBV virusunun replikasyonunu inhibe ettiğini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; İNOS eksikliği bulunan farelerde HBV'nin viral replikasyonunda, T lenfositlerin HBV spesifik sitotoksik nonsitopatik inhibitör etkilerine karşı dirençli oldukları görülmüştür. Bunu da intrahepatik IFN- $\gamma$  'nın indüksiyonuna bağlamışlardır. Aksine IFN- $\alpha$  /  $\beta$  'nın indüksiyonunda bu direnci görememişlerdir. Buradan hareketle IFN- $\gamma$ 'nın NO aracılı antiviral etkisi olduğunu, aksine IFN- $\alpha$  /  $\beta$ 'da ise antiviral etkinin NO aracılı olmadığını söylemişlerdir (57).

Woodchuck hepatitis virusu hepatit B'ye benzeyen bir DNA virusudur ki bu HBV'nin indüklediği hepatokarsinogenesisin bir modelidir (107). Liu ve arkadaşları WHV ile enfekte ağaçkakanlarda lipopolisakkarit ve arginin verilmesinden sonra hepatokarsinojen olan N-nitrosometilamin ve nitratın üriner salınımının arttığını rapor etmişlerdir. Bu olguda; WHV'nin indüklediği sebest radikal, nitrik oksit; süperoksitle birleşerek peroksinitrat oluşturur. Peroksinitrat hızla protonlanarak yüksek toksiteye sahip hidroksil radikali ve nitrojen dioksit oluşturur. Daha ileri çalışmalarında Liu ve arkadaşları, enfekte hayvanlardan elde ettikleri hepatositlerin, nitrik oksit üretimine katkıda bulunan hepatokarsinojen N-nitrosomorfolin ürettiğini bulmuşlardır (107). Woodchuck hepatitisle enfekte ağaçkakanlarda, nitroso bileşiklerinin artması, nitrik oksit sentezinin artmasını sağlayan

nitrik oksit sentetaz enziminin (NOS) aktivitesini artırmaktadır. Dighiero ve arkadaşları sitomegalo virusla enfekte retinaları bulunan AIDS'li hastalarda nitrik oksit sentetazın indüklenebilir formunun (iNOS) arttığını rapor etmişlerdir (108).

Sonuç olarak NO salınımı, Woodhuck hepatit virusuyla enfekte hepatositlerde olduğu gibi, n-nitrosobileşikleri gibi kanserojen bileşiklerin salınmasına (108) neden olan bu etki kronik HBV taşıyıcılarında karaciğer karsinoması gelişmesi açısından önemli bir risk faktörü olabilir (120).

Kronik hepatit ve Woodchuck hepatitinde total intrahepatik demir ve bir pro-oksidan olan düşük ağırlıklı demirin karaciğerde arttığı görülmüştür. Senba ve arkadaşları hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ile Kupffer hücrelerinde demir depolanması arasında güçlü bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir (109). Zou ve arkadaşları Hepatit B virusunun sekonder enfeksiyonu olan hepatokarsinomalı hastalarda yaptıkları çalışmada, hücrede replike olan HBV'nin demir birikimiyle uyumlu olduğu yorumunu getirmişlerdir (110).

Çalışmamızda plazma TNF-  $\alpha$  aktivitesi, AHBV'li grupta kontrole göre %150 oranında yüksek, KHBV'li grupta kontrole göre % 42 , KHBVIFN grubunda ise KHBV 'li gruba göre % 8.6 oranında düşük, kontrole göre % 54 oranında yüksek bulundu. Gruplar arasına istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). Grupların ikili karşılaştırılmasında ise KHBV ile AHBV arasında, KHBV ile Kontrol arasında, AHBV ile kontrol arasında anlamlı bir fark gözlemlendi. Bu bulgular Amaro ve arkadaşlarının HBV enfeksiyonunda NO üretiminin arttığı ve pX proteinin, NF- $\kappa$ -B'nin indüksiyonuyla, iNOS promotorlarını TNF alfa aracılığıyla artırdığı hipotezini desteklemektedir (120). Schwarz ve arkadaşlarının TNF'nin mitokondriyal solunum zincirinin II. kısmını inhibe ederek, süperoksit üretimi ile pro-oksidan etki yaptığı ve TNF'nin , sitoplazmik inhibitör proteinden (IkB), nükleer transkripsiyon faktör kappas B (NF- $\kappa$ -B) 'nin salınımını da sağladığı görüşünü destekliyor (101). Yine Koziel ve arkadaşlarının, TNF  $\alpha$ 'nın HBV mRNA'yı posttranslayonel mekanizma ile inhibe ettiği görüşünü desteklemektedir (24). Müller ve Zelinski (124) TNF'nin lenfosit içi AHBV'da azaldığını, fakat diğer hepatitlerde bu durumun gözlenmediği, diğer yandan Muto ve arkadaşları (125), TNFve IL-1 'in fulminant hepatit de artmış bulurken , akut hepatit A ve B 'de monositlerde normal miktarlarda TNF üretildiğini rapor etmişlerdir. Hepatit B virusunun enfekte ettiği kronik hepatitli hastaların hepatositlerinde mononükleer hücre infiltratında ve enfekte karaciğerdeki Kupffer hücrelerinde, nitrik oksit ve artmış intrasellüler demirin pro-oksidan etkisinin yanında TNF-  $\alpha$  immuno reaktivitesinin artması söz konusudur. Ayrıca hepatoblastoma hücrelerinin

HBV'nin tam genomuyla veya X geni ile enfeksiyonu sonucu TNF-  $\alpha$  salınımı olur (113). Diğer yandan TNF-  $\alpha$  'nın, HBV transgenik farelerde HBV'ye özel mRNA'yı azalttığı ile ilgili çalışmalar vardır (114,24). TNF, dolaşımdaki aktif fagositlerden veya bazı enfeksiyonlarda bireyin enfekte hücrelerinden sentezlenir. Her iki durumda da TNF bireyin mitokondrisinde, mitokondriyal solunum zincirinin II. kısmını inhibe ederek, süperoksit üretimi ile pro-oksidan etki yapar. Bu etki vitamin E gibi antioksidanlarla inhibe edilebilir. TNF, sitoplazmik inhibitör proteinden (IkB), nükleer transkripsiyon faktör kappa B (NF- $\kappa$ -B) 'nin salınımını da sağlar. NF- $\kappa$ -B' nin salınımından sonra, NF- $\kappa$ -B, DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı yer olan nukleusa, transloke olarak viral veya hücrel genlerin transkripsiyonunu indükler. NF- $\kappa$ -B 'nin indüklediği gen transkripsiyonu tiyol vericileri gibi belli antioksidanlarla inhibe edilebilir (101).

Bizim çalışmamızda, eritrosit GSH-Px aktivitesi açısından akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre % 34 oranında azalmış, kronik hepatit B(KHBV) 'li grupta kontrole göre % 13 oranında azalmış, kronik hepatit B'li olup interferon tedavisi alan grupta (KHBV-IFN), kontrole göre % 44 artmış, KHBV'li gruba göre % 67 oranında artmış GSH-Px aktivitesi bulduk. Bu da bize akut hepatit B'de azalan antioksidan kapasitenin, enfeksiyon kronikleştikçe biraz artmış fakat yine kontrole göre az, interferon tedavisi alan hastalarda bu oranın kontrolü de aşacak düzeye gelmiş olması interferonun antioksidan kapasiteyi artırdığı yönündeki düşünceleri destekliyor.

Eritrosit SOD aktivitesi yönünden sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmasa da AHBV'li grupta kontrole göre % 6.5 oranında azalma, KHBV'li grupta kontrole göre %49 oranında artma, interferon tedavisi alan grupta kontrole göre % 51 oranında artma, KHBV'li gruba göre 1.5 oranında artma olduğunu bulduk. Akut dönemde azalmış SOD, aktivitesini artan süperoksit radikal üretimiyle antioksidon aktivitenin kompanze etmeye çalışılması sonucu azaldığını söyleyebiliriz. Kronik dönemde ise antioksidan aktivitesinin artması akut dönemdeki şiddetli enfeksiyonun azalmaya başlamasını gösterebilir. İnterferon tedavisi de yine antioksidan aktiviteyi artırmakta olduğunu bulduk.

Eritrosit GSH-Px aktivitesi,yaşlılarda ve Dawn sendromunda yüksek, prematürlerde düşük, lökosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (43). Kronik etanolla beslenen ratlarda, Safra kanalı tıkanması, Halotan toksisitesinde GPX'in azaldığı görülmüştür.

Eritrosit katalaz aktivitesi, AHBV'de kontrole göre %30 oranında azalmış, kronik dönemde kontrole göre %15.7 oranında artmış, interferon tedavisi ile yine kontrole göre %50 oranında artma olduğunu ve KHBV'li gruba göre %30 oranında artma olduğunu

bulduk. Burada da eritrosit SOD aktivitesi ile paralel ama interferon yanıtında, antioksidan seviyesi açısından daha iyi bir sonuç olduğunu gördük.

Viral enfeksiyonlar oksidan stres aracılığıyla karaciğer kanserine kadar giden bir çok patolojik durum oluşturabilir. Hepatite neden olan viruslar arasında Picorna, Filavi, hepadna, caliciviruslarla, delta ajanının birlikte bulunduğu hepatit B virusları karaciğerde ciddi hasara neden olurlar (45, 97). Sadece hepatit B virusunda klasik olarak bireyin genomunda viral etkileri içeren viral karsinogenezis mekanizması görülür (98). Hepatit B enfeksiyonunda önemli olan , yıllarca sürmesi ve bazı bakteri ve parazit enfeksiyonuyla birlikte olması ve reaktif oksijen (ROT) ve nitrojen (RNT) türlerinin artmasıdır (99). Son çalışmalarda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin; genotoksik etkilere ilave olarak, doku hasarı oluşturur ki bu da, hücre proliferasyonunun artmasına, tipik doku tamir mekanizması ile mutasyonların gelişmesine yol açarak kanser oluşumuna sebep olduğu görülmüştür (100). Oksidatif stresle birlikte virusların indüklediği fagositlerin aktivasyonu, sadece reaktif oksijen türleri ile değil aynı zamanda aktive olan fagositlerden, tümör nekrozis faktör ve interlökin 1 gibi pro-oksidan sitokinlerin salınımı ile olur. Bunlar retikuloendoteiyal sistemden demir alınımını artırır. ROT; süperoksit, singlet oksijen, hidrojen peroksit, yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikalini içerir. Sadece ROT değil aynı zamanda ROT'un indüklediği lipid peroksidleri mitokondriyal solunum ve membran transportu gibi canlı hücrelerin disfonksiyonuyla sonuçlanan hücre membranı ve dolaşımında hasara neden olur. Görüldüğü gibi ROT hücrel hasar oluşturan etiyolojik bir faktör olarak görülmektedir (101).

Bannister ve arkadaşları Hepatit B viral genomunun bulunduğu, hepatoma hücre sınırı olan Hep 3B 'de Cu/Zn SOD'u, Mn SOD'u kadar azalmış olmakla birlikte, azalmış katalaz aktivitesi, glutatyon peroksidazın ve GST'nin hiç bulunmaması, ferritinin 270 katı üzerine çıkması ve hücre içi demir miktarının normal karaciğere göre 25 kat arttığını tesbit etmiştir (111). Fakat DiBisceglie ve arkadaşları, kronik hepatit'de demir içeriğinin 80 hastanın sadece 4'ünde arttığını bulmuşlardır (112). Hepatit B virus ailesinde (Woochuck hepatitis virus, Pekin ördeği virusu, yer solucanı hepatitis virusu) ve hepatit B viral genlerinin transgenik fare modellerinde antioksidan ajanların tedavi edici etkisi görülmemesi şaşırtıcıdır. Antioksidanların, hepatitB X geni ve hepatit B MHBs + transaktivatör tarafından yapılan transaktivasyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Hagen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hepatitB virusunun büyük zarf proteinin bulunduğu transgenik farelere hepatic DNA hasarını önlemek amacıyla antioksidan olarak vitamin E kullanılmış ve

başlangıçta herhangi bir etki görülmezken daha sonraları DNA hasarının önlendiğini görmüşlerdir (106).

Lenfosit içi GSH-Px aktivitesi akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre% 17.3 'lük bir azalma varken, kronik hepatit B (KHBV) 'li grupta kontrole göre % 35'lik artma olduğu ve Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrole göre %51 oranında azalma, KHBV'li gruba göre %22 oranında azalma olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. ( $p<0.05$ ) Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda KHBV'li grupla AHBV 'li grup, AHBV ile Kontrol grubu, KHBV ile Kontrol grubu, KHBV ile KHBV-IFN grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Tolentino ve arkadaşlarının kronik hepatit B'de lenfosit içi interferon yanıtın azaldığı görüşünü tam olarak desteklemeyip kısmen desteklemektedir çünkü AHBV'de azalan lenfosit içi antioksidan GSH-PX, KHBV'de artmış ve IFN tedavisiyle artan aktivite azalmıştır. Boya ve arkadaşlarının kronik hepatit C'de lenfosit içi GSH-Px düzeyini normal bireylerden farklı bulmazken, total glutatyon düzeyini azalmış ve okside glutatyon düzeyinin artması ve sitozolik glutatyon düzeyini yüksek bulmaları ile lenfosit içi glutatyon turnoverinin arttığı görüşünü desteklemektedirler. Yine bizim çalışmamızda, akut ve kronik hepatit B'de hepatositlerle birlikte lenfositlerin de etkilendiği gözlemlenmektedir (115).

Lenfosit içi SOD aktivitesi, akut hepatit B (AHBV)'li grupta kontrole göre% 27 oranında azalma varken, kronik hepatit B (KHBV) 'li grupta kontrole göre % 6.8 'lik bir artma olduğu ve Kronik hepatit B'li olup interferon  $\alpha$  (KHBV-IFN) tedavisi alan grupta kontrole göre %10 'luk bir azalma varken, KHBV'li gruba göre %16'lık bir azalma olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. ( $p<0.05$ ) olarak bulundu. Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma sonucunda KHBV'li grupla AHBV 'li grup, AHBV ile Kontrol grubu, KHBV\_IFN ile Kontrol grubu, KHBV ile KHBV-IFN grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi. Bu bulgular Boya ve arkadaşlarının lenfosit içi SOD aktivitesinin Kronik Hepatit C'de artmasıyla paralellik göstermekte ve artmış süperoksit radikalının TNF-alfa tarafından indüklenerek arttığı görüşünü desteklemektedir (115). Boya ve arkadaşları, mononükleer hücrelerde antioksidan sistem ve glutatyon metabolizmasını kronik hepatit C'de araştırmışlar ve katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz düzeyini normal bireylere yakın bulmuşlar. Mononükleer hücrelerdeki glutatyon düzeyleri ile normal bireyler arasında istatistiki olarak fark bulunamamış fakat kronik hepatit C'li hastalarda glutatyon düzeyi %35 oranında düşük, okside glutatyon düzeyi % 35 oranında yüksek olarak bulunmuştur. Lenfositlerde sitosoldeki glutatyon sentez

mekanizmasının önemli derecede kontrole göre artmış olması, kronik hepatit C (KHCV) 'li hastalarda artmış glutasyon turnoverini gösteriyor. Yine aynı çalışmada lenfosit içi MDA ve SOD aktivitesinin artmış olduğu rapor edilmiştir. SOD'un antioksidan koruma sisteminde süperoksiti hidrojen peroksite dönüştürme gibi önemli bir rolü olduğunu biliyoruz. Artmış SOD aktivitesini süperoksit radikalinin salınımının artmasına bağlamışlardır. Yine bu hastalarda daha önce yapılan çalışmada artmış lenfosit içi Mn-SOD mRNA düzeylerini doğrulamaktadır (115).

Viruslar pro-/antioksidan dengede nitrik oksit ve demir üretimi gibi hücrel prooksidanların salınımını artırarak ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin sentezini inhibe ederek etki gösterirler. ROT teorik olarak, viral mutantlar ve/veya mutasyonlar oluşturarak bireyin hücreindeki redoks durumunu değiştirerek ve NF- $\kappa$ -B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek etkisini gösterir (101).

DNA viruslarından olan Hepatit-B virusunda; nötrofillerin arttığı ve kronik aktif hepatit B virusu bulunan çocuklarda yapılan bir çalışmada, süperoksit anyonunun artmış olduğu gözlenmiştir.(104) Yine kronik aktif hepatiti bulunan erişkinlerde yapılan bir çalışmada sitümüle olan nötrofillerde süperoksit anyonunun kontrole göre azalmış olduğu gözlenmiştir (105). Yine de hepatit B virusuyla ilgili transgenik hayvanlarda yapılan çalışmalar, aktive fagositlerden üretilen ROT'un bu virusun hepatokarsinogenesisdeki rolünü açıklar ve belki de ROT'un kimyasal karsinogenesisde oynadığı rolle benzer olduğu düşünülebilir. Hagen ve arkadaşlarının transgenik farelerde yaptığı çalışmada, hepatit B virusunun geniş zarf şeklindeki polipeptid yapısı, karaciğerde preneoplastik kısımda artmış oksidatif DNA hasarını göstermişlerdir (106). Bu araştırmacılar aktif hepatik kupffer hücrelerinden ROT 'un sentezlendiğini ve oksidatif DNA hasarına neden olduğunu öne sürmüşlerdir (101).

Viral enfeksiyonların indüklediği, apopitozis süresince birey hücreindeki pro-/antioksidan dengenin rolü, serbest radikal biyolojisi, viroloji ve onkoloji arasında önemli rol oynamaktadır. Apopitozis yani programlı hücre ölümü, aktif hücre öldürülmesi yolunda glutasyon-peroksidaz ve N-Asetil sistein gibi scavenger peroksitler olan antioksidanlar ayrı bir morfolojik karakter sergiler. Bir çok virus, viral enfeksiyonların doğal bir süreci olarak apopitotik sitotoksite üretir (101,103).

Viral hepatitlerin iyileşmesinde hücrel immunitenin önemi büyüktür. Hepatit B enfeksiyonunda, bozulmuş hücrel immünite olduğu yine hemodiyalizle tedavi edilen Down sendromu, leproz, lenfositik lösemi ve kronik böbrek yetmezliğinde olduğu gibidir. İlave olarak viral enfeksiyonlarda, lenfosit sitümulasyonu ve deri testleri aracılığıyla



hücrel immünitenin bozulduğu tesbit edilmiştir (116). Dudley ve arkadaşları hücre aracılıklı immün yanıtın hepatit B'nin klinik seyrinde önemli bir yeri olduğunu öne sürmüşlerdir. Ve yeterli immün yanıtı olan HBV'li bireylerde klinik olarak iyileşme ve karaciğer hasarının düzelmesinde önemli rolü olduğunu, fakat yetersiz immün yanıtı olan bireylerde kronik HBsAg taşıyıcılığı olması sözkonusu olduğunu rapor etmişlerdir (117).

Takashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada interferonun indüklediği enzim olan 2'-5' oligoadenilat sentetaz (2-5 OAS) aktivitesini lenfosit içi viral hepatitli hastalarda araştırmışlar; erken dönemde akut enfeksiyonda ve kronik tip B hepatitinde enzim aktivitesinin arttığını, fakat akut hepatit A 'da ve non A ve non B hepatitinde önemli bir enzim artışı olmadığını rapor etmişlerdir. Sadece iki hepatit A'lı hastada enzim artışı olduğunu gözlemişlerdir. Kronik hepatit B'li hastalarda lenfosit içi enzim aktivitesine interferon tedavisi sırasında bakmışlar ve enzim aktivitesinin artmış olduğunu bulmuşlardır. Bu artışın DNA-polimeraz aktivitesindeki azalma ile paralel seyretmekte olduğunu gözlemişler. Bu enzimin ölçülmesi, kronik hepatit B'nin tedavisinde interferon tedavisinin uygun dozunu ayarlama ve etkinliğini araştırmada önemli olacağını ileri sürmüşler (118). Bu çalışmada interferonun kandan kolayca temizlenmesi nedeniyle, lenfositlerde uzun süre kalması nedeniyle bu enzimi lenfosit içi çalışmışlar.

Levin ve Hahn 'ın yaptığı çalışmada, antiviral immün mekanizmada interferon sisteminin aktivasyonunu araştırmışlar. Viral hepatitli 16 hastada kan interferon yanıtını yükselmiş bulmuşlar ve hücrelerin hemen antiviral durumu indüklediğini görmüşler. 6 akut fulminant hepatitli hastada antiviral interferon sistemin bozuk olduğunu gözlemişler. Bu 6 hastada mononükleer hücreler antiviral konuma geçmemiş ve interferon alfa veya interferon gamma üretmediği gözlenmiş. Fulminant hepatitli 5 hastada interferon alfa tedavisi ile interferon sistemlerinde hızla aktivasyon ve hızlı bir iyileşme gözlenmiştir. Bu çalışmada yoğun viral hepatitin tedavisinde interferonun erken dönemde verilmesi önerilmiştir (119).

Tolentino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kronik viral enfeksiyonlarda interferon üretiminin azaldığını araştırmışlar. Kronik hepatit B 'de immunolojik yanıtın bozulduğunu ve lenfosit içi interferon yanıtının azaldığını bulmuşlardır (6).

Sitokinlerin karaciğerde amino asit metabolizması, protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında önemli rolü vardır. Ayrıca mineral metabolizmasında, safra salınması da bazı sitokinlerden etkilenmektedir. Sitokinler aynı zamanda, travma veya enfeksiyon gibi durumlarda, karaciğerdeki protein metabolizmasındaki değişikliklerden sorumludur. Bu değişiklikler; amino asit sentezinin bozulması, kaslarda protein yıkılımının artması, periferden

karaciğere geçen amino asit değişiklikleri oluşturmaktadır. Bunun yanında akut faz protein sentezi ve glukoneogenesis karaciğerde artar (121).

Bizim IL-1 -  $\beta$  sonuçlarımızda, sadece AHBV'li grupta bir artış olduğu ve diğer gruplarda değerler  $<5$  olduğundan, sadece AHBV 'li grupta diğer gruplar arasında istatistiki analizlerde fark anlamlı olarak gözlemlendi. Plazma IL-6 seviyeleri ise, AHBV'li grupta kontrole göre artış gözlenirken, diğer gruplarda değerler  $<5$  olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiki olarak fark gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Bu sonuçlar Torre ve arkadaşlarının, akut viral hepatitte IL-1-  $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 ve TNF-  $\alpha$  'nın arttığını gösteren çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Burada görülen artışın sebebini akut fazda lipopolisakkaritlerin indüklediği makrofaj sitümlasyonuna veya viral enfeksiyonda karaciğerde bu sitokinlerin temizlenmesinin bozulmasına bağlayabiliriz. Kupffer hücrelerinin vücudun makrofaj deposu olduğunu biliyoruz. Kupffer hücreleri sitokinlerin salınımına, virus ve değişik bakteriyel ürünlerle (endotoksinler gibi) makrofajlardan sitokin salınımını indüklerler (24).

IL-2R sonuçlarımız ise, AHBV'li grupta kontrole göre % 70'lik bir artış varken, KHBV 'li grupta kontrole göre % 17,4'lük azalma olduğu ve KHBV-IFN grubunda KHBV grubuna göre % 47'lik azalma, kontrole göre % 21.7'lik bir artış olduğunu görüyoruz. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi. ( $P<0000.1$ ) Bu veriler Andus (121); Muller (122) ve arkadaşlarının, akut viral hepatit de sIL-2 reseptör konsantrasyonu serumda hızla artarken, kronik hepatit B 'de lenfositler (T lenfosit aktivasyonunun bozulması nedeniyle) daha az IL-2 ve IL-2 reseptörünü üretir hipotezini desteklemektedir. Kronik viral hepatitlerde, hücrel immun yanıt değişir ve bu hepatosellüler nekroza neden olur fakat virüsü temizlemeye yetecek seviyeye gelemmez. İmmun sistemde oluşan değişikliklerin sebebini araştırırken, sitokinlerin hareketi ve salınımı ile ilgili bir çok değişiklik oluştuğu görülmüştür. Mononükleer hücreler ve fibroblast kaynaklı IFN-  $\alpha$  'nın kronik HBVenfeksiyonunda virus replikasyonunu kontrol eder. KHBV'li hastalarda, kısmende olsa IFN  $\alpha$  ve  $\beta$ 'nin üretiminde eksiklik olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu hastaların interferona yanıtı azalmıştır. Yine de eksojen IFN  $\alpha$  'ya yanıt verirler. ( Bu da hepatositlerde IL-2 aracılığıyla T lenfosit aktivasyonu, IL-2 reseptör üretimiyle ve insan lenfosit antijeninin artması (HLA) ile sağlanır.) Akut viral hepatit de sIL-2 reseptör konsantrasyonu serumda hızla artarken, kronik hepatit B 'de lenfositler (T lenfosit aktivasyonunun bozulması nedeniyle) daha az IL-2 ve IL-2 reseptörünü üretir. Bu da immunoregülasyonun bozulduğunu ve viral replikasyonun devamlılığını gösterir (121,122).

Bu verilerden hareketle antiviral ve IFN'nin immunostimulatör etkisiyle kronik viral hepatitlerin IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  ve IL-2 ile tedavi edilmesinin uygun olduğunu söyleyebiliriz.

Bizim çalışmamızda plazma içi IL-8 aktiviteleri , AHBV'li % 372 oranında yani çok fazla bir artış olduğu görülmektedir. KHBV'li grupta yine kontrole göre % 28 oranında bir artış olduğu ve KHBV-IFN'li grupta KHBV'li gruba göre% 30'luk bir azalma ile kontrole yaklaşmış olduğu görülmektedir. Gruplar arasındaki fark anlamlı idi..(p<0.001) Yapılan bir çalışmada, IL-8, IFN-  $\alpha$ 'nın antiviral etkisini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu etkinin ise tamamen doza bağımlı bir etki olduğu tesbit edilmiştir. Yani bizim verilerimizdeki AHBV'li gruptaki, proinflamatuvar kemokin olan IL-8 'in bu orandaki artışın sebebini bu etkiye bağlayabiliriz. Bulgulardan görüldüğü gibi KHBV'li grupta bu kadar fazla artış görülmemektedir. Masumato ve arkadaşları(127), IL-8'in kronik hepatit B'de artış olduğunu, Mahe ve ark. IL-8 'nin HBX proteininin artmasında rolü olduğunu; IL-1 -  $\beta$  TNF-  $\alpha$ 'nın IL-8'in artmasını indüklediğini yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, Interferon alfa tedavisi alan bir kronik hepatit C'li grupta serum TNF düzeyi düşük iken, IL-8 düzeyi yüksek bulunmuştur (128). Cui ve ark. 'nın A, B, C viral hepatitlerinde, IL-6, IL-8, TNF alfa düzeylerini lenfosit içi çalışmışlar ve bu üç parametrenin artmış olduğunu ve IFN alfa seviyesinin azalmış olduğunu üç viral hepatit grubunda da gözlemişlerdir. Fakat gruplar arasında istatistiki bir fark gözlememişlerdir (130).

Aktif monositler, nötrofillerden **laktoferrini** içeren ve lizozomal proteinlerin salınımını sağlayan IL-1 salarlar. Lactoferrin hızla demire bağlanarak akut yangı durumlarında demir eksikliğine sebep olur. Böyle durumlarda demir retikulo endotelial sistemde birikir. Eğer demir birikimi, hücrel demir bağlama kapasitesini aşarsa, serbest prooksidan demir **Fenton** reaksiyonuyla süperoksitle reaksiyona girerek yüksek derecede reaktif hidroksil radikali oluşturur. ROT''un viral patogenezdaki bir başka rolü, immun aktivasyonda hem viral enfeksiyonun eradikasyonunda, hem de immun sistemin indüklediği hücre hasarında, pozitif modulatör etkisi vardır. T lenfositlerin proliferasyonu, hücrel immün yanıtta anahtar bir rol oynar. Hunt ve arkadaşları, antioksidanların, antijen-sunucu hücrelerde (APC) inkübe ettikleri T lenfositlerin proliferasyonunu inhibe etmesi üzerine yoğun çalışmalar yapmıştır (102). Proliferasyonun inhibisyonu, doza bağımlıdır ve rezonans stabilize edici serbest radikal scavenger olan butylated hydroxyinasole kadar desferoxamine ve desferrithiocin gibi demir şelatörleri ile olur. Antioksidanlar, aynı zamanda antijen yoluyla sitümüle olup, hücre proliferasyonu için esansiyel yapı olan poliaminlerin sentezi için gerekli, hız kısıtlayıcı enzim ornitin dekarboksilazın sentezini inhibe eder. Antioksidanlardan aminotiyol bileşiği, sistamin (cysteamine), transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu; T hücre aktivasyonu ile birlikte inhibe eder (101).

Sonuçlardan da görüldüğü üzere, eritrosit içi antioksidan enzim aktiviteleri AHBV'de azalmış, KHBV'de de (glutasyon düzeyi hariç) artmış ve interferon tedavisi ile de antioksidan enzim aktiviteleri de bir miktar birlikte artmış görülmektedir. Fakat lenfosit içi SOD ve GSH-Px seviyeleri, enfeksiyonun akut döneminde azaldığı, KHBV'de arttığı gözlenmiş ve IFN tedavisi ile bu artma kontrole yaklaşmış olduğu görülmektedir. Lenfosit içi NO seviyeleri ise viral hepatitlerin daha çok lenfosit içi aktiviteleri değiştireceğini düşünerek çalıştığımızda gerçekten de AHBV'li grupta aşırı derecede artışın olduğu, KHBV'de ve özellikle IFN tedavisi alan grupta kontrole yaklaştığını görüyoruz. Yine sitokin aktivitelere de baktığımızda, IL-1 $\beta$ , IL-2R, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  düzeyleri, AHBV'li grupta hepsinde artış, KHBV'de genel olarak azalma ve IFN tedavisi ile kontrole hemen hemen yaklaştığını görüyoruz. Bu verilerle diğer çalışmalar arasında farklar görülebilir, bu farkların sebepleri arasında; çalışma koşullarının, kullanılan reaktiflerin ve malzemelerin, ölçüm yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Ama sonuç olarak şunu söyleyebiliriz; Hepatit B virusunda eritrosit içi ve lenfosit içi aktiviteler birbirleriyle çok fazla paralellik göstermemektedir. Bunun sebebini de viral enfeksiyonlarda hücrel immun yanıtın önemli rol oynadığı özellikle lenfositler aracılığıyla oluşan koruma mekanizmasında CD8/ CD4 hücre oranının rolünü, sitokinlerin aktivitesiyle birlikte araştırarak lenfosit içi antioksidan aktivitenin daha doğru sonuçlar gösterdiğini söyleyebiliriz. Lenfosit içi çalışmanın antioksidan aktivitede daha doğru sonuçlar alınabileceği ile ilgili Belouqui ve ark.(131) 'nın da plazma içi ve lenfosit içi glutasyon düzeylerini (glutasyon prekürsörü) N-asetil sistein (NAC) ile IFN tedavisinin etkinliğini kıyaslamak için yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamızla paralel olarak lenfosit içi bulguların daha anlamlı sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. Antonova ve ark.(132) akut viral hepatit B 'de yine lenfosit içi SOD aktivitesi, antioksidan enzim aktivitesi, hastalığın periyodu ve şiddetine göre değiştiğini göstermişlerdir. Hastalığın şiddeti arttıkça lenfosit içi metabolitlerin miktarı artmakta, enfeksiyonun şiddeti azaldıkça miktarda azalmakta olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgularda yine bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Lenfositlerin özelliği, vücudun immun reaksiyonlarını göstermesi nedeniyle hastalığın şiddetini, prognozunu, iyileşme sürecini araştırmak açısından önemlidir. Ayrıca interferon tedavisinin viral hepatit B gibi önemli bir hastalığın tedavisinde tek başına yeterli olmayacağını, antioksidanlarla kombine bir tedavinin etkili olacağını söyleyebiliriz.

Ülkemizde (% 3.9-12.5) ve dünyada ( orta endemisite gösteren yerlerde %2-10) bu kadar yaygın olan ve akut hepatitin ortalama % 5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir kısmının siroza dönüştüğü, sirozlu olgularda da hepatosellüler kanser gelişmesi riskinin

oldukça fazla olduğu bilinen bir gerçektir. Bu yüzden, HBV’de eritrosit içi ile beraber lenfosit içi antioksidan aktivitenin araştırıldığı kısıtlı denecek düzeyde çalışma olduğundan; hem tedavi hem de teşhis açısından, özellikle sitokinlerle kombine araştırmanın, gelecekte interferon tedavisinden başka, değişik antioksidan ajanların uygulanarak HBV’nin tedavi edilmesi açısından bu çalışmanın önemli olacağını düşünmekteyiz.



### SUMMARY:

The aim of the present study was to investigate possible involvement of oxidant stress in the patients and treated with IFN-alpha. For this purpose we studied the Glutathion peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in erythrocytes, and glutathion peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) activity, nitric Oxide (NO) concentration in lymphocytes, and IL-1 $\beta$ , IL-2R, IL-6, IL-8, TNF-  $\alpha$  levels were studied in (35  $\pm$  15 ages) plazma of 30 acute (AHBV), 30 chronic (CHBV) and 30 chronic (CHBVIFN) but interferon -  $\alpha$  treated 30 control subjects.

Erythrocyte CAT activity of the AHBV group was found to be lower than the erythrocyte CAT activity of the control group whereas increased value was measured for CHBV and CHBV-IFN groups. Erythrocyte GSH-Px activity were lower in AHBV and CHBV but higher in CHBV-interferon  $\alpha$  treated subjects with comparison of control. This differencenesses were statistically significant ( $p < 0.05$ ). There was slightly differencenesses in SOD activity of AHBV, CHBV, and CHBV-IFN  $\alpha$  groups, but these differencenesses statistically were not significant.

Lymphocyte GSH-Px activity were found lower than the control in AHBV and CHBV-IFN treated groups but the value was 35 % higher in CHBV group and this was significant ( $p < 0.001$ ). Lymphocyte SOD activity of the AHBV and CHBV-IFN groups were found to be lower than the control groups, but there is slightly increase in CHBV. Lymphocyte NO levels were increased in AHBV and CHBV groups than control group but the level of NO was decreased in CHBV-IFN treated groups. Comparison all of these differencenesses with control were found significant ( $p < 0.001$ ).

IL-1 $\beta$ , detectable in 38 % of AHBV group, but could not be detected in the other groups. IL-6 levels were found 22.6 % increased in AHBV than control group. But could not be detected in the others groups. IL\_2R levels were increased in AHBV and CHBV-IFN groups but were lower in CHBV group with comparison of control. IL-8 levels were increased in AHBV and CHBV group than control groups. We found that the TNF-  $\alpha$  levels were increased in AHBV , CHBV and CHBV-IFN groups than control groups.

These results suggest that the lymphocytes were found to reflect the immune reactiveness of the body and could be used for evaluating the severity of the disease, prognostication and the achievement of convalescence. We suggest that the combined therapy of alpha-interferon with other agents were playing an important rol in the treatment of hepatitis B patients.

## ÖZET:

Bu çalışmada, Hepatit B'li hastalarda oksidatif stresin rolünü ve interferon alpha tedavisinin eritrosit ve lenfosit antioksidan seviye ile nitrik oksit düzeyleri ve bazı sitokin düzeylerine etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px), superoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi; lenfosit içi glutatyon peroksidaz (GSH-Px), superoksid dismutaz (SOD) ve nitrik oksit (NO) metaboliti olan total nitrit düzeyi ile ; plazma içi IL-1 $\beta$ , IL-2R, IL-6, IL-8, TNF-  $\alpha$  düzeyini 30 akut, 30 kronik ve 30 interferon -  $\alpha$  tedavisi alan kronik hepatit B'li hastada ve 30 kontrol grubunda mukayeseli olarak çalıştık.

Eritrosit katalaz aktivitesi; AHBV'li grupta kontrole göre düşük iken KHBV'li ve KHBV-IFN'li grupta kontrole göre artma olduğu olduğu gözlemlendi. Eritrosit GSH-Px aktivitesi; AHBV ve KHBV'de kontrole göre düşük iken, KHBV-IFN tedavisi alan grupta kontrole göre artma gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. (P< 0.05)

Eritrosit SOD aktivitesi yönünden AHBV, KHBV ve KHBV\_IFN alfa tedavisi alan grupta kontrole göre hafif bir artış olduğu görüldü. Gruplar arasında istatistiki olarak fark bulunamadı.

Lenfosit içi GSH-Px aktivitesi; AHBV'li ve KHBV-IFN'li grupta kontrole göre düşme olurken, KHBV'li grupta kontrole göre % 35 oranında artış olduğu gözlemlendi. İstatistiki olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0.001). Lenfosit içi SOD aktiviteleri, AHBV VE KHBV-IFN'li grupta düşük bulunurken, aksine KHBV'li grupta hafif bir artma olduğu gözlemlendi. Lenfosit içi NO düzeylerinde, AHBV'li ve KHBV'li gruplarda kontrole göre artma varken, KHBV-IFN  $\alpha$  tedavisi alan grupta KHBV'li gruba göre istatistiki olarak anlamlı azalma gözlemlendi. (p<0.001)

IL-1 $\beta$  düzeyleri % 38 oranında AHBV'li grupta (ort = 6.9), fakat diğer gruplarda tesbit edilemeyecek seviyede idi. IL-6 'de AHBV'li grupta kontrol grubundan yüksek bulunurken, diğer gruplarda tesbit edilemeyecek düzeyde idi. IL\_2R düzeyleri, AHBV'li grupta ve KHBV-IFN'li grupta kontrol grubundan yüksek, fakat KHBV' li grupta kontrolden düşük bulundu. IL-8 düzeyleri, AHBV'de ve KHBV'de artma gözlemlendi. TNF-  $\alpha$  düzeyleri, AHBV , KHBV and KHBV-IFN 'li grupta kontrole göre artma gözlemlendi.

Bu sonuçlar, lenfositlerin vücudun immun yanıtını ve hastalığın ilerleyişini, prognozunu ve iyileşme sürecini tesbit etmede kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca interferon alfa tedavisi ile antioksidanların kombine olarak kullanılmasının Hepatit B'nin tedavisinde etkili olabileceği görüşünü desteklemektedir.

## KAYNAKLAR

- 1.) **Pietrangelo A.** Metals, oxidative stress and hepatic fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, 16:13-30; 1996
- 2.) **Suematsu T., Kamada T., Abe H., Kikuchi S., Yagi K.** Serum lipoperoxide level in patients suffering from liver disease. **Clin Chim Acta**, 79:267; 1997
- 3.) **Swietek K., Juszczyk J.** Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. **J. Viral Hepat**, 4(2):139-41; 1997
- 4.) **Paradis V., Kollinger M., Fabre M., Holstege A., Poynard T., Bedosa P.** In situ detection of lipid peroxidation by products in chronic liver diseases. **Hepatology**, 26:135-42; 1997
- 5.) **Datta V., Sengal S., Pal S. R., Dhalkk, Singh S., Datta D. V.** Lymphocyte subpopulation in acute viral hepatitis. **Gut** 23(11):927-30; 1982
- 6.) **Tolentino P., Dianzoni F., Zucca M., Giacchino R.** Decreased interferon response by lymphocytes from children with chronic hepatitis. **J. Infect Dis**, 132 (4):459-61; 1975
- 7.) **Ren H., Zhengu F., Jia C. P.** Tumor necrosis factor and interleukin 6 in hepatitis C. virus infection. **Chung Hua Ko Tso Chih** 31(6):344-81; 1992
- 8.) **Koziel M.** Immunology of viral hepatitis. **Am J. med**, 100(1):98-104; 1996
- 9.) **Chisari F. V., Ferreri C.** Hepatitis B. virus immunopathogenesis. **Ann Rev Immunol**, 29-60; 1995
- 10.) **Eckels D. D., Flomenberg P., Gill J. C.** Hepatitis C. virus:models of immunopathogenesis and prophylaxis. **Transfusion**, 36:836-844; 1996
- 11.) **Tsai S. L., Huang S. N.** T. cell mechanisms in the immunopathogenesis of viral hepatitis B. and C. **J. Gastroenterol Hepatol**, 12:227-235; 1997
- 12.) **Mc Caughan G. W., Napoli J., McGuinness P., et. all.** T1 ve T2 cytokine responses in chronic HCV:implications for mechanisms of liver injury. **Viral Hepatitis Reviews**, 3:129-142; 1997
- 13.) **Kılıçturgay K., Badur S.** **Viral Hepatit 2001**, Viral hepatitle Savaşım Derneği, 86-117; 2001
- 14.) **Mandell L. G., Bennett J. E., Dolin R., Principles and Practice of Infectious Diseases**, 5 th ed. Philadelphia. Curghill Livingstone. 1279-1331; 2000
- 15.) **Lee M. W.** Hepatitis B. virus infection. **N. Engl J. Med.** 337:1733-1745; 1997
- 16.) **Moradpour D., Wands J. R.** Understanding hepatitis B. virus infection. **N. Engl J. Med.** 332:1092-1093; 1995
- 17.) **Szmunness W., Much N. I., Prince A. M., et al.** On the role of sexual behavior in the spread of hepatitis B. infection. **Ann Intern Med.** 83-489, 1975
- 18.) **Krugman S., Giles J. P.** Viral Hepatitis. New light on an old disease. **JAMA.** 212-1019; 1970
- 19.) **Chang M. H., Chen C. J., Lai M. S., et al.** Universal hepatitis B. vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellüler carsinoma in children. **N. Engl J. Med.** 336:1855-1859; 1997
- 20.) **Feldman M., Scharschmidt B. F., Sleisinger M. H.** Update:Recommendation to prevent hepatitis B. virus transmission- United States. **JAMA**, 274:603-604; 1995
- 21.) **Terrault N. A., Wright T. L.** Viral hepatitis A. through G., In **Gastrointestinal and Liver Disease**. 6th ed. Philadelphia. WB Saunders. 1123-1170; 1998



- 22.) **Tünger A., Baskan A.** Metay hacettepe mikrobiyoloji. 6. ed. Saray Medical. 220-221; 1997
- 23.) **Foster G. R., M., R., C., P.,** Interferons in Host Defense. Seminars in Liver Disease. Vol:17, No:4 287-29; 1997
- 24.) **Koziel M. J.,** Cytokines in viral hepatitis. Seminars in liver Disease. Vol:19, No:2, 157-169; 1999
- 25.) **Villeneuve J. P., Desrochers M., Infante –Rivard C., et al.** A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B. surface antigen-positve carriers in Montreal. Gastroenterology. 106:1000-1005; 1994
- 26.) **Mosmann T. R., Sad S.,** The expanding universe of T-cell subsets:Th1, Th2, and more. Immunology Today. 17:138-146; 1996
- 27.) **Burtis C. A., Ashwood E. R.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 21:541-605; 1999
- 28.) **Callard R., Gearing A.,** The Cytokine Facts Book. Orlando, Acedemic Press; 1994
- 29.) **Moniuszko T., Rutkowski R., Chyrek – Brownska S.** Production of selected cytokines by monocytes (IL-1 $\beta$ , IL-6 ) and lymphocytes (IL-2 ve IL-4) in peripheral blood of patients with nonallerjic bronchial asthma treated with Broncho-Vaxom. Pneumol. Alergol. Pol., 2:66-70; 1995
- 30.) **Seymour G. J., Savage N. W., Walsh L. J.,** Immunology:An Introduction for the Health Sciences. New York, McGraw-Hill; 1995
- 31.) **Mukaida N. N., Harada A., Yasuma K., Matsushima K.,** Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin-8 (II-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). Microbiol Immunol 36:773-789; 1992
- 32.) **Van Meir E., Ceska M., Effenerger F., et al.** Interleukin-8 is produced in neoplastic and infectious diseases of the human central nervous system. Cancer Res. 52:4297-4305; 1992
- 33.) **Vassalli P.,** The pathophysiology of tumor necrosis factors. Ann Rev Immunol 411-452; 1992
- 34.) **Ranges G., Zlotnik A., Espevic T., Dinarello C., Cerami A., Palladino M.** Tumor necrosis factor  $\alpha$ / cachectin is a. growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. J. Exp. Med 167:1472-1478; 1988
- 35.) **Yokota S., Geppert T., Lipsky P.** Enhancement of antigen and mitogen-induced human T. lymphocyte proliferation bytumor necrosis factor-  $\alpha$ . J. Immunol 140:531-536; 1988
- 36.) **Preedy V. R., Reilley M. E., Mantle D., Peters T. J.** Oxidative Damage In Liver Disease. JIFCC Vol:10 No:1, 16-19; 1998
- 37.) **Kenneth B. B. and Bruce N. A.** The free radical theory of aging matures. Physiol Reviews 78 (2):547-81; 1998
- 38.) **Tanırgan G., Koldaş M., Uras F., Serbest Radikaller:**an Introduction to free radical biochemistry. Haseki Tıp Bülteni. 32 (4):304-308; 1994
- 39.) **Kenneth B. B., Bruce N. A.,** The free radical theory of aging matures. Physiol Reviews 78 (2):547-581; 1998
- 40.) **Einster E. F.,** Oxygen Radicals- Biochemical Basis for their Efficacy. Klin Wochenschr. 69:949-956; 1991

- 41.) Peterhans E., Oxidants and Antioxidants in Viral Disease: Disease Mechanisms and Metabolic Regulation. Symposium: Newly Emerging Viral Diseases: What Role for Nutrition? *J. Nutr.* 127:962-965; 1997
- 42.) Oxel F., Kasirga E., Taneli B. Wilson's cirrhosis: As A Free Radical Disease (Facts And Speculations). Second Congress of National Pediatric Gastroenterology and Nutrition. İstanbul; 1996
- 43.) Idris A. Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza yayınları, Konya, 1-61; 1995
- 44.) Harman D. Aging And Oxidative Stress, *JFCC*; Vol. 10 No. 1, 24-27; 1998
- 45.) Peterhans E. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Viral Disease. *Biological Trace Element Research.* 56:107-116; 1997
- 46.) Bleau G., Giasson C., Brunette I. Measurement of Hydrogen peroxide in biological samples. *Anal Biochem.* 263:13-17; 1998
- 47.) Wink D. A., Nims R. W., Saavedra J. E., Utermahlen W. E., Ford P. C. The fenton oxidation mechanism: Reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol:91, 6604-6608; 1994
- 48.) Hiraishi H., Terano A., Razandi M., Sugimoto T., Harada T., Ivey K. J. Role of Cellular Superoxide Dismutase against Reactive Oxygen Metabolite Injury in Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol:267, 14812-14817; 1992
- 49.) Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A., Nitric Oxide. Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol Review.* 43 (29):109-137; 1991
- 50.) Lancaster J. Nitric Oxide, Principles and actions. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA. ; 1996
- 51.) Knowles R. G., Moncada S. Nitric Oxide Synthase in mammals (review). *Biochem J.*, (England) 298:249-258; 1994
- 52.) Marletta M. A. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *J. Biol Chem* 268 (17):1231-1235; 1993
- 53.) Lepoivre M., Feischi F., Fontecave M. Inactivation ribonucleotid reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Com* 179:442-448; 1991
- 54.) Patel R. K., McAndrew J., Sellak H., et. al. Biological aspects of reactive nitrogen series. *Biochem Biophys Acta*, 1411:385-400; 1999
- 55.) Monzon G. C., Majono P. L., Zubia I., Sanz P., Apolinario A., Otero M. R., Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *Journal of Hepatology* 32:331-338; 2000
- 56.) Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B. A. and Rafael R. Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration, *Chem Res Toxicol* 9:390-396; 1996
- 57.) Guidotti L. G., McClary H., Loudis J. M., Chisari F. V. Nitric Oxide Inhibits Hepatitis B. Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice. *J. Exp. Med.* 191:1247-1252; 2000
- 58.) Southorn P. A., Powis G. Free radicals in medicine, involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.* 63:390-408; 1988
- 59.) Slater T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. Review. *Biochem J.* 222:1-15; 1984

- 60.) Pastor M. C., Sierra C., Dolade M., Novarro E. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of down's syndrome patients. *Clin. Chem* 44 (5):924-929; 1998
- 61.) Kwan O. K., Lee S. M., Floyd R. A., Park J. W. Thiol-dependent metal catalyzed oxidation of copper, zinc superoxide dismutase. *Biochem Biophys Acta* 1387:249-256; 1998
- 62.) Fong K. L., McCay P. B., Poyer J. L. Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J., Biol. Chem.* 248:7792-7797; 1973
- 63.) Lunec J. Free radicals:their involvement in disease process. *Ann Clin Biochem.* 27:173-182; 1990
- 64.) Fridovich I., Superoxide radical:An endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23:239-257; 1983
- 65.) Moraes E., Keyse S., Tyrell R. Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells:A moleküler analysis. *Carcinogenesis.* 11:283-293; 1990
- 66.) Watala C., Bryszewska M., Stefaniak B., Nowak S. Peroxide metabolism enzymes in diabetic children:relationship to duration and control of diabetes. *Klin Wochenschr* 63 (16):765-768; 1985
- 67.) Coles B. B., Rhodas K. Smoking nitric oxide and free radicals. *British J., Of Surgery* 81:1693-1700; 1994
- 68.) Davies K. J. A., Delsignore M. A., Protein and carbohydrate damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol Chem* 18:91-104, 1987
- 69.) Nielsen F., Mikkelsen B. B., Nielsen J. B. Plasma malondialdehyd as biomarker for oxidative stress. *Clin. Chem.* 43(7):1209-1241; 1997
- 70.) Helle R. A., Jesper B. N., Flemming N. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 43 (4):562-568; 1997
- 71.) Jones D. P., Carlson J. L., Samies P. S., Sternberg P. Glutathion measurement in human plasma. *Clin Chem. Acta* 175-184; 1998
- 72.) Mc Cord J. M., Fridovich I. The Reduction of Cytochrome C. By Milk Xanthine Oxidase *J. Biol Chem.* 243-5753-60; 1968
- 73.) McCord J. M., Fridovich I. Süperoxide dismutase. In function for erythcuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055; 1969
- 74.) Oberley L. W. Süperokside dismutase and cancer. In:Süperokside dismutase. Oberley L. W. edit, CRC pres Florida vol:2, 127-165; 1982
- 75.) Weisiger R., Fridovich I. Superoxide dismutase organelle spesificity. *J., Biol. Chem.* 248:3582-3592; 1973
- 76.) Steinman H. Süperoxide dismutases:Protein chemistry and structure-function relationships. In:Superoxide dismutase, Oberley L. W. CRC press. vol:11-68; 1982
- 77.) Nordman R., Ribiele C., Rovach H. Implication of Free Radic. *Biol. Med.* 12:219-240; 1992
- 78.) Nordman R. Alcohol And Antioxidant Systems. *Alcohol Alcohol* 29:513-522; 1994
- 79.) Yost F. J., Fridovich I. An iron containing superoxide dismutase from E. Coli. *J. Biol. Chem.* 248:4905-4908; 1973
- 80.) Marklun S. L., Holme E., Hellner L. Superoxide dismutase in extracellüler fluids. *Clin. Chem. Acta* 126:41-51; 1982
- 81.) Keele B. B., McCord J. M., Fridovich I. Süperoxide dismutase from Escherichia Coli. A new manganese containing enzyme. *J. Biol Chem* 245:6176-6181; 1970

- 82.) Oberley L. V., Clair S. K. D., Autor A. D., Oberley T. D. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*. Vol:254, No:1, 69-80; 1987
- 83.) Jenkins R. R., Tengi J. Catalase activity in skeletal muscle of varying fiber types. *Experientia*. 37:67-68; 1981
- 84.) Percy M. E., Can J. Catalase an old enzyme with a new role ? (review) *Biochem Cell Biol*. 62:1006-1014; 1984
- 85.) Jones D. P., Eklöv L., Thor H., Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase. *Arch Biochem Biophys*. 210:505-516; 1981
- 86.) Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J. Clin Lab Invest* 21:77; 1968
- 87.) Kunze-Mühl E. Observation on the effect of X-ray alone and in combination with ultrasound on human chromosomes. *Hum Gen*. 57:257-260; 1981
- 88.) Seshi B. Discovery of novel hematopoietic cell adhesion molecules from human bone marrow stromal cell membrane protein extracts by a new cell-blotting technique. *Blood*. vol:83, (9):2399-2409; 1994
- 89.) Lowry O., Roseburgh N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193:265-275; 1956
- 90.) Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods in Enzymology* 105:121-126; 1984
- 91.) Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 196:143-152; 1991
- 92.) Podczasy J. J., Wei R. Reduction of iodinitrotetrazolium violet by superoxide radicals. *Biochem Biophys Res Com* 150:1294-1301; 1988
- 93.) Pagia D. E., Valentina W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab Clin Med*; 70:158-169; 1967
- 94.) Cortas N. K., Wakid W. N. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*. 36/8 1440-1443; 1990
- 95.) Von Herbay A., Stahl W., Niederov C., et al. Diminished plasma levels of vitamin E in patients with severe viral hepatitis. *Free Radic. Res*. 25:461-466; 1996
- 96.) Nordstorm G., Seeman T., Hasselgren P. O. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 97:679-684; 1985
- 97.) Anonymous. The A to F of viral hepatitis. *Lancet* 336:1158-1160; 1990
- 98.) Milich D. R., Jones J., Huges J., Maruyama T. Hepatitis B virus infection, the immune response and hepatocellular carcinoma. *Ciba Found. Symp*. 187:113-129; 1994
- 99.) Ohshima H., Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res*. 305:253-264; 1994
- 100.) Ames B. N., Gold L. S., Willet W. C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 92:5258-5265; 1995
- 101.) Schwarz K. B. Oxidative Stress during viral infection: A Review. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol:21, 5:641-649; 1996
- 102.) Hunt N. H., Van Reyk D. M., Fragonas J. C., Jeitner T. M., Goldstone S. D. Redox mechanism in T cell activation. in: oxidative stress cell activation. *Viral Infect*. 237-251; 1994

- 103.) Weiss L., Hildt E., Hofschneider P. H. Anti- hepatitis B. virus activity of N-acetyl-L-Cystein (NAC):new aspects of a well- established drug. **Antiviral Research.** 32:43-53; 1996
- 104.) Vierucci A., Demartino M., Graziani E., Rossi M. E., London W. T., Blumberg B. S. A mechanism for liver cell injury in viral hepatitis:Effects of hepatitis B. virus on neutrophil function in vitro and in children with chronic active hepatitis. **Pediatr. Res.** 10:814-820; 1983
- 105.) Uera M., Sato N. Impaired ability of neutrophils to produce oxygen- derived free radicals in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 20:326-330; 1994
- 106.) Hagen T. M., Huang S., Curnette J., et. al. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91(26):12808-12812; 1994
- 107.) Liu R. H., Jacob J. R., Tennant B. C., Hotchkiss J. H. Nitrite and nitrosamine synthesis by hepatocytes isolated from normal woodchucks (*Marmota monax*) and woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. **Cancer Res.** 52:4139-4143; 1992
- 108.) Dighiero P., Reux L., Hauw J. J., Fillet A. M., Courtois Y., Goureau O. Expression of inducible nitric oxide synthase in cytomegalovirus- infected glial cells of retinas from AIDS patients. **Neuro sci. Lett.** 166:31-34; 1994
- 109.) Senba M., Nakamura T., Itakura H., Statistical analysis of relationship between iron accumulation and hepatitis surface antigen. **Am. J. Clin. Pathol.** 84:340-342; 1985
- 110.) Zhou Z., Detolla L., Custer P., London T. Iron, Ferritin, Hepatitis B. surface and core antigens in the livers of Chinese patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer.** 59:1430-1437; 1987
- 111.) Bannister W. H., Federici G., Heath J. K., Bannister J. V. Antioxidant systems in tumour cells:The levels of antioxidant enzymes, ferritin, and total iron in a human hepatoma cell line. **Free Radic. Res. Commun.** 1:361-367; 1986
- 112.) Di Bisceglie A. M., Axiotis C. A., Hoofnagle J. H., Bacon B. R. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology.** 102:2108-2113; 1992
- 113.) Gonzalez-Amaro R., Garcia-Monzon C., Garcia-Buey L., et. al Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$ . production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. **J. Exp. Med.** 179:841-848; 1994
- 114.) Guidotti L. G., Guilhot S., Chisara F. V. Interleukin-2 and alpha/beta interferon downregulate hepatitis B. virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and independent pathways. **J., Virol.** 68:1265-1270; 1994
- 115.) Boya P., Pena A., Beloqui O., Larrea E., Marian C., Castelruiz Y., Civeira M. P., Prieto J. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. **Journal of hepatology.** 31:808-814; 1999
- 116.) Wicks R. C., Kohler P. F., Singleton J., W. Thymus- derived lymphocytes in type B. acute viral hepatitis and healthy carriers of hepatitis B. surface antigen (HBsAg). **Digestive Disease.** Vol:20, 6:518-522; 1975
- 117.) Dudley F. J., Fox R. A., Sherlock S. Cellular immunity and hepatitis associated Australia antigen liver disease. **Lancet.** 1:723-726; 1972
- 118.) Sugawara T., Matsushima T., Miyazaki T., Toyota J., Fujii N., Minagawa T. Activities of 2'- 5' oligoadenylate synthetase with viral hepatitis, and chronic type B. hepatitis during Interferon therapy. **Jap J. Med.** Vol:25, 2:144-148; 1986

- 119.) Levin S., Hahn T. Interferon system in acute viral hepatitis. *Lancet*. 592-594
- 120.) Amaro J. M., Bartolome J., Carreno V. Hepatitis B. virus X. protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology*, Vol:29, No:3, 915-923; 1999
- 121.) Andus T., Bauer J., Gerok W. Effects of Cytokines on the liver. *Hepatology*. Vol:13, No:2, 364-375; 1991
- 122.) Muller C., Knoflach P., Zielinski C. C. Soluble interleukin 2 receptor in acute viral hepatitis and chronic liver disease. *Hepatology*. 10:928-932; 1989
- 123.) Torre D., Zeroli C., Giola M., Ferrario G., Fiori G. P., Bonetta G., Tambini R. Serum levels of Interleukin-1  $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , interleukin -6 and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis. *Clinical Infectious Diseases*. 18:194-198; 1994
- 124.) Müller C., Zielinski C. C. Impaired lipopolysaccharide-inducible tumor necrosis factor production in vitro by peripheral blood monocytes of patients with viral hepatitis. *Hepatology*. 12:1118-1124; 1990
- 125.) Muto Y., Nouri-Aria K. T., Meager A., Alexander G. J. M., Edleston A. L. W. F., Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet*. 2:72-74, 1988
- 126.) Khabar K. S. A., Al-Zoghaibi F., Al-Ahdal M. N., et. Al. The  $\alpha$ . chemokine, Interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon  $\alpha$ . *J. Exp. Med.* Vol:86, No:7, 1077-1085; 1997
- 127.) Masumoto T., Ohkubo K., Yamamoto K., Ninomiya T., Abe M., Akbar S. M., Michitaka K., Horiike N., Onji M. Serum IL-8 levels and localization of IL-8 in liver from patients with chronic viral hepatitis. *Hepatogastroenterology*. 45(23):1630-4; 1998
- 128.) Mahe Y., Mukaida N., Kuno K., Akiyama M., Ikeda N., Matsushima K., Murakami S. Hepatitis B. virus X. protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J. Biol Chem*. 25; 266 (21):13759-63; 1991
- 129.) Neuman M. G., Benhamou J. P., Martinot M., et. al. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Clin Biochem*. 32(7):537-45; 1999
- 130.) Cui W., Dong Y., Fang F., Li G. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, interleukin-8, and interferon alpha in children with viral hepatitis. *J. Tongji Med Univ*. 18(4):247-9; 1998
- 131.) Beloqui O., Prieto J., Suarez M., Gil B., Qian C. H., Garcia N., Civeira M. P. N-acetyl cysteine enhances the response to interferon-alpha in chronic hepatitis C: a pilot study. *J. Interferon Res*, 13(4):279-82; 1993
- 132.) Antonova T. V., Nikolaenko S. L. Intensity of the peroxidation of membrane lipids and metabolism of lymphocytes in viral hepatitis patients. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (5):64-7; 1998