

Kronik Viral Hepatitli Hastalarda Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

The Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Chronic Viral Hepatitis

Fatih DEDE,¹ Mehmet KÖŞ,¹ Neslihan BUKAN,² Didem ŞENER,¹
Mehmet DEMİR,¹ Özkan AYDIN,¹ Mehmet ARHAN,¹ Erdal ESKİOĞLU¹

ÖZET

Amaç: Kronik viral hepatitin gelişimi ve hastalığın progresyonunda, serbest oksijen radikalleri etkili olmaktadır. Bu çalışmada, kronik viral hepatit tanısı alan hastalarda, farklı oksidatif stres belirteçleriyle viral hepatite neden olan etyolojik faktörler arasındaki ilişkiyi ve kronik viral hepatitli hastalardaki oksidatif stres durumunu değerlendirdik.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, kronik viral hepatit tanısı almış 21 hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubu üzerinde yapıldı. Bu hastalardan alınan kan örneklerinde, nitrik oksit düzeyini ölçmek için nitrit+nitrat ve lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için malondialdehit (MDA) düzeyleri değerlendirildi.

Bulgular: Kronik viral hepatitli hastaların nitrit+nitrat düzeyleri $105,42 \pm 15,51$ $\mu\text{mol/L}$ saptanırken, kontrol grubundaki sağlıklı hastaların nitrit+nitrat düzeyleri $84,13 \pm 6,36$ $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). Serum MDA değerleri kronik viral hepatitli hastalarda $23,63 \pm 4,68$ $\mu\text{mol/L}$ iken, kontrol grubunda $10,36 \pm 1,36$ $\mu\text{mol/L}$ olarak düşük saptandı ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). Kronik viral hepatitin etyolojisine göre yapılan değerlendirmede, oksidatif stres belirteçleri arasında farklılık saptanmadı.

Sonuç: Biz, kronik viral hepatitli hastalarda oksidatif stresi gösteren belirteçlerin yükseldiğini, ancak bu yüksekliğin hastalığa neden olan viral ajanlarla bir ilişkisi olmadığını saptadık.

Anahtar sözcükler: Hepatit B; hepatit C; kronik viral hepatit; lipid peroksidasyonu; nitrik oksit; oksidatif stres.

SUMMARY

Objectives: Free oxygen radicals are known to be effective on the progression and development of chronic viral hepatitis. In this study, the relationship between different markers of oxidative stress and the etiological factors of chronic viral hepatitis was evaluated. Additionally, the status of oxidative stress in patients with chronic viral hepatitis was investigated.

Methods: The study involved 21 patients with chronic viral hepatitis and a control group of 20 healthy people. Malondialdehyde (MDA) levels in blood samples were examined to determine the levels of nitric oxide and nitrite+nitrate, and to evaluate the lipid peroxidation.

Results: While the levels of nitrite+nitrate in patients with chronic viral hepatitis were 105.42 ± 15.51 $\mu\text{mol/L}$, the levels in the control group were 84.13 ± 6.36 $\mu\text{mol/L}$. The difference between the results was statistically significant ($p < 0.001$). Serum MDA levels in patients with chronic viral hepatitis and in the control group were 23.63 ± 4.68 $\mu\text{mol/L}$ and 10.36 ± 1.36 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The difference between the results was statistically significant ($p < 0.001$). When the oxidative stress markers in different causes of chronic viral hepatitis were compared, no difference was observed.

Conclusion: An increase in oxidative stress markers in patients with chronic viral hepatitis does occur, but the elevation is not related to the type of viral hepatitis.

Key words: Hepatitis B; hepatitis C; chronic viral hepatitis; lipid peroxidation; nitric oxide; oxidative stress.

Geliş tarihi (Submitted): 13.05.2011 Kabul tarihi (Accepted): 13.07.2011

¹Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Dahiliye Kliniği, Ankara;

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

İletişim (Correspondence): Dr. Fatih Dede. e-posta (e-mail): fatded@yahoo.com

GİRİŞ

Hepatit B ve hepatit C virüs enfeksiyonuna bağlı gelişen kronik viral hepatitler, halen tüm dünyada kronik karaciğer hastalığının etyolojik nedenleri arasında ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ünde, kronik hepatit C virüsü enfeksiyonu mevcuttur. Bunun yanında, her yıl tüm dünyada 1 milyondan fazla kişi, B hepatitine bağlı komplikasyonlar nedeniyle kaybedilmektedir. Viral hepatitler ilerleyici karaciğer hastalığı, siroz ve hepatosellüler kanser gelişimi için yüksek risk oluşturmakta ve halen tedavide etkin bir başarının sağlanamaması nedeniyle, yüksek mortalite ve morbiditeye sahip hastalıklar arasında yer almaktadır.^[1-4]

Serbest oksijen radikalleri, proteinlerin denatürasyonu, nükleik asitlerde hasarlanma ve lipid peroksidasyonu aracılığıyla, membran yapısında ve hücrel fonksiyonlarda bozukluklara neden olmakta ve birçok hastalığın patogenezinde rol almaktadır.^[5] Karaciğer hastalıklarında, serbest oksijen radikalleri aracılığıyla gelişen oksidatif stresin neden olduğu karaciğer hasarının, hastalığın ilerleyişi ve komplikasyonların gelişimi üzerine olan etkisi çözüm bekleyen önemli bir sorundur. Serbest oksijen radikallerinin karaciğerin sentez fonksiyonları, ilerlemiş karaciğer hastalığının seyrinde gelişen sistemik hemodinamik bozukluklar ve hatta hepatosellüler kanser gelişimi gibi komplikasyonlardaki yeri tartışılmaya devam etmektedir. Nitrik oksit (NO) yolağı ve son ürünleri, hepatosit fonksiyonunun düzenlenmesinde etkin rol alan serbest oksijen radikallerindedir.^[6-8] Bunun yanında, farklı faktörlere bağlı gelişen karaciğer hastalıklarında, karaciğer nekrozuna kadar gidebilen değişikliklerin seyrinde lipid peroksidasyonu aracılığıyla gelişen hepatosit hasarı, patogeneizde önemli rol oynamaktadır.^[7-10]

Bu çalışmada, hepatit B ve/veya hepatit C'ye bağlı kronik viral hepatit tanısı alan hastalarda, farklı oksidatif stres belirteçleriyle viral hepatite neden olan etyolojik faktörler arasındaki ilişkiyi ve sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında, kronik viral hepatitli hastalardaki oksidatif stres durumu değerlendirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma

Hastanesi'nde yatarak veya ayaktan tedavi gören, kronik viral hepatit tanısı almış ve daha önce viral hepatite yönelik herhangi bir tedavi kullanmamış, 12'si erkek, 9'u kadın olmak üzere toplam 21 hasta ve hiçbir sistemik hastalığı olmayan 20 kontrol grubu üzerinde yapıldı. Çalışmaya dâhil edilen hastalara kronik viral hepatit tanısı, fizik muayene, rutin laboratuvar tetkikleri, viral belirteçler (HbsAg, anti-HBc, HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA, Anti-HCV, HCV-RNA) ve abdominal ultrasonografi (USG) sonrasında yapılan karaciğer biyopsisi ile konuldu. Otoimmün hepatit tanısını dışlamak üzere, tüm hastalardan serolojik belirteçler istendi ve otoantikör pozitifliği saptanan hastalar çalışmaya alınmadı. Karaciğer enzim yüksekliğine neden olabilecek sistemik veya lokal hastalık, enfeksiyöz ajan ve toksik madde maruziyeti gibi nedenler dışlanarak, en az 6 ay süreyle karaciğer enzimleri yüksekliği ve HbsAg pozitifliği olan, HBV-DNA titresi 2000 IU/ml'nin üzerinde olan tüm hastalara karaciğer biyopsisi yapıldı. Knodell skorlamasına göre histolojik aktivite indeksi 7 ve üzeri olanlar (intralobüler dejenerasyon ve fokal hepatosellüler nekroz, portal inflamasyon, periportal nekroz ve köprüleşme nekrozu ve fibrozis parametreleri değerlendirilerek) çalışmaya alındı. Benzer şekilde, karaciğer enzim yüksekliğine neden olabilecek sistemik veya lokal hastalık, enfeksiyöz ajan ve toksik madde maruziyeti gibi nedenler dışlanarak, en az 6 ay süreyle karaciğer enzimleri yüksekliği olan, Anti-HCV ve HCV-RNA pozitifliği olan tüm hastalara karaciğer biyopsisi yapılarak, kronik viral C hepatiti tanısı konuldu. Kontrol grubu, son 1 ay içinde aktif enfeksiyon geçirmemiş ve herhangi bir nedene bağlı olarak ilaç kullanım öyküsü olmayan, tamamen sağlıklı bireylerden seçildi.

Hastalardan alınan kan örnekleri 4000 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra, serumları ayrılarak deney gününe kadar -70 °C'de saklandı. Bu hastalardan alınan kan örneklerinde bir serbest radikal türevi olan NO düzeyini ölçmek için nitrit+nitrat ve oksidatif hasara bağlı gelişen lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için de, malondialdehit (MDA) düzeyleri çalışıldı. Nitrat ve nitrit düzeyleri, kolorimetrik olarak ölçüldü. Nitrit düzeyleri, Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon metodu kullanılarak ölçüldü. Serum örnekleri eşit hacimde Gri-

es reaktifıyla (1g/L sülfonilamid, 25g/L fosforik asit ve 0,1g/L N.1.naftiletilediamin) muamele edildi, 15 dakika oda sıcaklığında renk değişene kadar beklendikten sonra, 550 nm’de absorbanlar distile suya karşı ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol/litre}$ olarak verildi.^[11] Nitrat düzeyi ise, β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (β -NADPH) varlığında nitratın, nitrat redüktazla nitrite dönüşmesi prensibiyle ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol/litre}$ olarak verildi.^[12] Serum MDA miktarının tayini Kunino Yağı yöntemiyle ölçüldü. Yöntemin esası, tiyobarbitürik asitle (TBA) reaksiyona giren MDA’nın reaksiyon sonucu oluşturduğu pembe renkli maddenin spektrofotometrik olarak 535 nm’de, n-bütanole karşı absorbanının ölçümü şeklindedir. Sonuçlar $\mu\text{mol/litre}$ olarak verildi.^[13]

Karaciğer biyopsisinde aktivite skoru düşük (Knodell skoru <7) ve kronik karaciğer hastalığını gösteren biyopsi skoru yüksek hastalar, HDV ve HIV pozitifliği, otoimmün hepatit, malnütrisyon varlığı, serum albümin <3,5 mg/dl, hemoglobin < 12 g/dl olması, akut veya kronik enfeksiyon varlığı, 3 aydan az yaşam beklentisi olan hastalar, cilt tümörleri hariç malignite varlığı, akut koroner sendrom, akut karaciğer hastalığı, karaciğer sirozu, kronik böbrek hastalığı, evre 3-4 kalp yetmezliği, son 6 ayda antioksidan ilaç veya vitamin kullananlar, alkol ve sigara kullanan hastalar çalışmaya alınmadı.

Çalışmadan elde edilen veriler, “SPSS for Windows ver. 13.0” istatistik paket programına girildi ve analizleri bu programda yapıldı. P değerinin 0,05’den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İncelenen 21 kronik viral hepatitli olgunun, %42,9’u kadın (n=9), %57,1’i (n=12) erkekti. Araştırmaya katılan hastaların yaş ortalaması $43,57 \pm 17,42$ olup, en küçüğü 18, en büyüğü 63 yaşındaydı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yaş ve cinsiyet açısından gruplar arasında farklılık yoktu. Kronik viral hepatit etyolojileri değerlendirildiğinde; 12 hastada HbsAg pozitifliği, 7 hastada Anti-HCV pozitifliği ve 2 hastada da HbsAg pozitifliğine eşlik eden Anti-HCV pozitifliği saptandı. Çalışma grubundaki tüm hastaların serum AST ve ALT değerleri normalden yüksek; albümin, protrombin zamanı ve bilirübin değerleri normal olarak saptandı. Kronik viral hepatitin etyolojisi ve tanı esnasında değerlendirilen biyokimyasal parametreler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Olguların nitrit+nitrat ve lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA değerlerinin ölçümü Tablo 2’de verilmiştir. Kronik viral hepatitli hastaların nitrit+nitrat düzeyleri $105,42 \pm 15,51 \mu\text{mol/L}$ olarak saptanırken; kontrol grubundaki sağlıklı hastaların nitrit+nitrat

Tablo 1. Çalışmaya alınan kronik viral hepatitli ve kontrol grubu hastalarının, biyokimyasal parametreleri ve etyolojik faktörlere göre dağılımı

	HbsAg (+) (n=12)	Anti-HCV (+) (n=7)	HbsAg ve Anti-HCV (+) (n=2)	Kontrol grubu (n=20)
AST (IU/L)	119,2±202,6	81,50±32,39	65,0±30,2	22,0±3,2
ALT (IU/L)	265,50±470,16	128,83±106,01	63,00±21,0	18,00±5,0
T. Protein (g/L)	71,29±3,74	75,00±1,89	76,00±1,55	74,00±1,70
Albümin (g/L)	44,40±3,59	42,00±2,00	47,00±3,30	44,50±2,50
ALP (IU/L)	99,90±30,69	156,50±68,97	109,00±18,10	89,00±11,03
GGT (IU/L)	33,40±23,53	38,17±22,24	32,00±17,20	32,00±7,40
T. Kol (mg/dl)	154,00±30,14	218,67±82,28	156,00±41,60	116,00±11,30
Trig. (mg/dl)	91,90±46,62	224,33±162,79	71,00±68,05	81,00±38,55
T. Bil ($\mu\text{mol/L}$)	11,58±10,20	16,71±8,13	13,70±7,8	9,40±1,6
D. Bil ($\mu\text{mol/L}$)	3,57±2,98	6,10±4,49	3,20±2,14	2,80±1,90
PTZ (sn)	13,28±0,97	12,43±0,44	11,67±0,15	10,7±1,17
INR	1,13±0,11	1,04±0,05	0,96±0,03	0,89±0,15

Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmaya alınan kronik viral hepatitli ve kontrol grubu hastalarının oksidatif stres belirteçleri

	Kontrol grubu	Çalışma grubu	p
Nitrit+nitrat (µmol/L)	84,13±6,36	105,42± 15,51	<0,001
Malondialdehit (µmol/L)	10,36±1,36	23,63±4,68	<0,001

Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

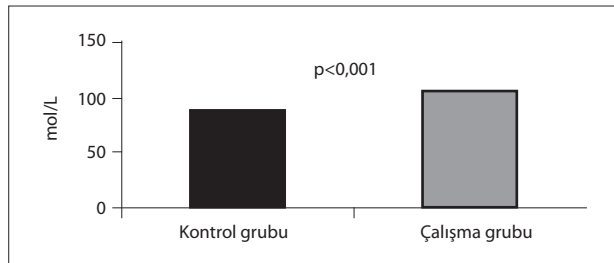
Tablo 3. Çalışmaya alınan kronik viral hepatitli hastaların, oksidatif stres belirteçleri ve etyolojik faktörlere göre dağılımı

	HbsAg (+) (n=12)	Anti-HCV (+) (n=7)	HbsAg ve Anti-HCV (+) (n=2)	p
Nitrit+nitrat (µmol/L)	103,70±19,14	111,88±9,38	109,82±7,61	0,227
Malondialdehit (µmol/L)	22,51±4,47	27,0±4,38	21,40±3,18	0,837

Tüm sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

düzeyleri 84,13±6,36 µmol/L olarak bulundu. Kronik viral hepatitli hastaların nitrit+nitrat düzeyleri yüksekti ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$) (Şekil 1). Serum MDA değerleri kronik viral hepatitli hastalarda 23,63±4,68 µmol/L saptandı. Kontrol grubunun MDA değerleriyse 10,36±1,36 µmol/L olarak düşük saptandı. İki grubun sonuçları karşılaştırıldığında, kronik viral hepatitli hastalarda MDA değerleri yüksekti ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$) (Şekil 2).

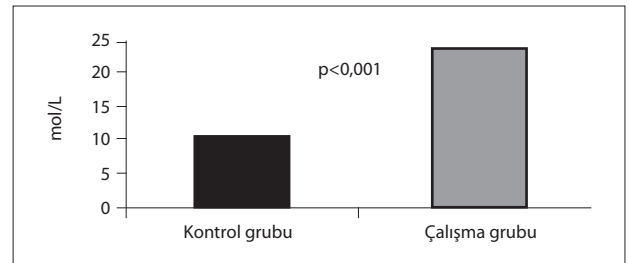
Kronik viral hepatitli hastalarda, kronik hepatite neden olan viral etyolojik faktör ve oksidatif stres belirteçleri gruplar arasında incelendiğinde; etyolojiye göre gruplar arasında fark saptanmadı. Anti-HCV pozitifliği olan grupta, MDA ve nitrit+nitrat değerleri diğer gruplardan daha yüksekti ancak anlamlı farklılık yoktu (Tablo 3).

**Şekil 1.** Çalışmaya alınan kronik viral hepatitli ve kontrol grubu hastalarının nitrit+nitrat düzeyleri.

TARTIŞMA

Biz, kronik viral hepatitli hastalarda oksidatif stresi gösteren belirteçlerin yükseldiğini, ancak bu yüksekliğin hastalığa neden olan viral ajanlarla bir ilişkisi olmadığını saptadık.

Kronik viral hepatitlerin patogeneğinde oksidatif stres ve virüs kökenli bazı maddelerin rol aldığı direkt sitotoksite sonucu gelişen immünolojik hasar suçlanmaktadır.^[2,14] Karaciğer, çeşitli onarım mekanizmaları ve koruyucu enzimler yanında, içerdiği bazı antioksidanlar sayesinde oksijen radikalleri aracılığıyla gelişen hasardan en çok korunan organlardan biridir. Buna rağmen özellikle viral hepatitlerde, uzun süreli enflamatuvar reaksiyon ve sonrasında kollajen sentezi artışıyla gelişen fibrozis, karaciğer sirozuyla sonuçlanabilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin, karaciğer hastalıklarının patofizyolojisinin

**Şekil 2.** Çalışmaya alınan kronik viral hepatitli ve kontrol grubu hastalarının MDA düzeyleri.

de yer aldığı ve hastalığın ilerlemesine neden olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Elde edilen verilerin tartışmalı olduğu nokta; problemin artmış oksidatif strese verilen cevapta yetersizlikle de ilişkilendirilebileceği gibi,^[15,16] bazı çalışmalarda bu radikallerin olumlu etkilerinden bahsedilmektedir.^[17,18]

Oksidatif stresin karaciğerde yağlanmayı artırarak, hepatositlerde inflamasyon ve sonuçta da nekroz gelişimine neden olduğu gösterilmiştir.^[2,19] Aynı zamanda, oksidatif stresin tetiklediği lipit peroksidasyonu ve yağlanma, siroza kadar ilerleyen kollajen sentezinde artış ve fibrozis gelişiminden sorumlu tutulmuştur.^[2,19,20] *In vitro* çalışmalarda, serbest oksijen radikallerinin, hepatosit protein sentezinde azalmaya neden olduğu da saptanmıştır.^[10] Oksidatif stres ve karaciğer hasarı arasındaki güçlü ilişki kabul edilmekle birlikte, hepatic mikrosirkülasyonda NO üretiminin azalmasının, parankimal doku hasarının gelişmesinde rol aldığı ileri sürülmektedir.^[21] Nitrik oksitin tümör hücreleri ve çeşitli mikroorganizmalara karşı savunma sisteminde görev aldığı ve makrofaj sitotoksitesinin ana mekanizmalarından birisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte NO'nun, herpes simpleks gibi bazı virüslere karşı kanıtlanmış antiviral aktivitesi gösterilmiştir.^[22]

Majano ve ark.^[23] kronik viral hepatitli hastalarda yaptıkları bir çalışmada, virüs dışı nedene bağlı karaciğer hastalığı olanlarla karşılaştırdıklarında, hepatotropik viral enfeksiyonlarda karaciğer hücrelerinde NO sentaz gen reseptör dışavurumunun uyarıldığını ve NO'nun kronik viral hepatitlerin patolojisinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Amaro ve ark.^[22] ise kronik viral C hepatitli hastalarda, interferon tedavisinin nitrit düzeyi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, nitrit düzeyi ile hepatosit hasarının derecesinin paralel seyrettiğini göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda, nirtrit+nitrat düzeylerini sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında, kronik viral hepatitli hastalarda daha yüksek olduğunu gösterdik. Nitrit+nitrat düzeyindeki bu yükseklik, hastalığın seyrinde oksidatif stresin arttığını göstermekte ve literatürle uyumlu olarak, hastalığın patogenezinde öne sürülen oksidatif stres aracılıklı hasarlanmayı destekler görün-

mektedir. Ancak, bizim çalışmamızda spesifik anti-viral veya antioksidan tedavi çalışmaya eklenmediğinden, mevcut değerlerin hastalığın progresyonuna olumsuz yönde etkilediği şeklinde bir yorum yapma şansımız olmadı. Viral hepatitin etyolojisine göre yapılan değerlendirmede ise, anti-HCV pozitifliği olan grupta nirtrit+nitrat düzeyleri diğer gruplardan daha yüksekti. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı.

Kronik karaciğer hastalıklarında, lipit peroksidasyonunun fibrozis ilişkisi sıkça araştırılmıştır. Paradis ve ark.^[24] kronik C hepatitli hastaların karaciğer doku örneklerinde, hastalığın evresi ve fibrozis skoru ile MDA düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Lipit peroksidasyon ürünlerinin fibrozisi uyardığını, bu etkinin önlenmesi durumunda siroza ilerleyişin engellenebileceğini ileri sürmüşlerdir. Daha sonraki çalışmalarda, interferon tedavisinin lipit peroksidasyonu üzerine etkisi değerlendirilmiş ve antiviral tedaviyle lipit peroksidasyonunun iyileştirilebileceği ve sonuçta ilerleyici karaciğer hastalığına neden olan enflamasyonun aktivitesinde düzelmeye sağlanabileceği gösterilmiştir.^[25] Bu olumlu etkinin, tedaviye N-asetilsistein gibi bir antioksidan madde eklenmesiyle daha da ileri gidebileceği gösterilmiştir.^[26] Çalışmamızda, MDA düzeyleri kronik viral hepatitli hastalarda belirgin olarak yüksek saptandı. Hastalık etyolojileri değerlendirildiğinde, bu yükseklik anti-HCV pozitifliği olan grupta daha belirgindi. Lipit peroksidasyonunun neden olduğu hasar düşünüldüğünde ve bu yükseklik hastalığın siroza ilerleyişinin yavaşlatılmasında dikkate alınması gereken bir sorun olarak karşımızda durmakla birlikte, bizim çalışmamız lipit peroksidasyonu ile fibrozis arasındaki ilişkiyi açıklayacak planlamayı içermemekteydi.

Biz, kronik viral hepatitli hastalarda oksidatif stresin arttığını ve daha önceki literatür bulguları dikkate alındığında, siroza ilerleyişte serbest oksijen radikallerinin etkili rol oynadıklarını düşünüyoruz. Bu yıkıcı etkilerin tedavisi önemli bir araştırma konusu olarak güncelliğini korumaktadır. Bu nedenle daha geniş vaka sayılı, farklı tedavi protokollerini de içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Kuzu F, Müderrisoğlu C, Ceylan B ve ark. Adefovir ve tenofovir kullanan kronik hepatit B'li olgularda tedaviye yanıtı belirleyen değişkenlerin incelenmesi. *İstanbul Tıp Derg* 2011;12:11-8.
2. Ozenirler S, Erkan G, Gülbahar O, et al. Serum levels of advanced oxidation protein products, malonyldialdehyde, and total radical trapping antioxidant parameter in patients with chronic hepatitis C. *Turk J Gastroenterol* 2011;22:47-53.
3. European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:227-42.
4. Craxi A. EASL clinical practice guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;28. [Epub ahead of print]
5. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481-93.
6. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991;337:776-8.
7. Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, et al. An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* 1989;169:1467-72.
8. Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, et al. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett* 1990;25:15-9.
9. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1992;103:1928-49.
10. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, et al. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 1989;170:1769-74.
11. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
12. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-6.
13. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
14. Boya P, de la Peña A, Belouqui O, et al. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31:808-14.
15. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91:14-22.
16. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-45.
17. Vuillemin E, Veal N, Croquet V, et al. Nitric oxide and liver diseases: deleterious or hepatoprotective role. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:892-902. [Abstract]
18. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, et al. Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:1392-7.
19. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996;21:291-5.
20. Casini A, Ceni E, Salzano R, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:361-7.
21. Battista S, Bar F, Mengozzi G, et al. Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. *J Hepatol* 1997;26:75-80.
22. Amaro MJ, Bartolomé J, Pardo M, et al. Decreased nitric oxide production in chronic viral hepatitis B and C. *J Med Virol* 1997;51:326-31.
23. Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* 1998;101:1343-52.
24. Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, et al. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. *J Clin Pathol* 1997;50:401-6.
25. Kageyama F, Kobayashi Y, Kawasaki T, et al. Successful interferon therapy reverses enhanced hepatic iron accumulation and lipid peroxidation in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1041-50.
26. Neri S, Ierna D, Antoci S, et al. Association of alpha-interferon and acetyl cysteine in patients with chronic C hepatitis. *Panminerva Med* 2000;42:187-92.