

T.C

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

129658

WILSON HASTALIĞI'NDA
OKSİDAN STRES, ANTİOKSİDAN VİTAMİNLER VE
TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE

UZMANLIK TEZİ

DR.NESRİN SÖNMEZ

129658

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. BUKET DALGIÇ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMAN YAYINLARI

ANKARA-2003

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	27
BULGULAR	31
TARTIŞMA	39
SONUÇLAR	54
ÖZET	57
KAYNAKLAR	59
EK TABLOLAR	74

KISALTMALAR

ATP	:Adenozin trifosfat
CCl ₄	:Karbon tetraklorür
Cu	:Bakır
DNA	:Deoksiribonükleik asit
Fe	:Demir
4-HNE	:4-Hidroksinoneal
H ₂ O ₂	:Hidrojen peroksit
HPLC	:Yüksek performanslı likit kromatografi
IFN- γ	:İnterferon gama
LDL	:Düşük dansiteli lipoprotein
MDA	:Malondialdehit
NO	:Nitrik oksit
NO ₂	:Nitrit
NO ₃	:Nitrat
NOS	:Nitrik oksit sentaz
O ₂	:Oksijen
OH ⁻	:Hidroksil radikali
ONOO ⁻	:Peroksinitrit
P-tip ATPaz	:P-tip adenozin trifosfataz
PUFA	:Poliansatüre yağ asidi
TEAC	:Troloks eşdeğer antioksidan kapasite
TBARS	:Tiyobarbitürik asit reaktif maddesi
TNF- α	:Tümör nekrozis faktör alfa
WD geni	:Wilson hastalığı geni

GİRİŞ VE AMAÇ

Basit bir enfeksiyondan en karmaşık sendromlara kadar pek çok hastalığın patogenezinde rol alan serbest radikaller, son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan birisini oluşturmaktadır. Serbest radikaller uygun koşullarda organizmanın dış etkenlere karşı savunma elemanları gibi çalışırken; kontrolsüz ve sürekli olduklarında karaciğer hastalıklarını da içeren pek çok hastalıkta doku hasarının patogenezinde rol alırlar (8,14,49,126,127,132,135). DNA, karbonhidrat ve protein hasarına yol açan serbest radikallerin en önemli hasar oluşturma mekanizması lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu zar yapısına doğrudan, diğer hücre yapılarına ise reaktif aldehitlerin (malondialdehit gibi) üretimi yoluyla dolaylı olarak zarar verebilir (14,126,127).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreler bazı koruyucu mekanizmalar içerirler. Bu savunma mekanizmalarından bir kısmı serbest radikal oluşumunu önleyerek, bir kısmı ise oluşmuş radikalın zararlı etkilerini engelleyerek etki eder (8,82,92,105,126,127,136). Araştırmalar, bu antioksidan savunma sistemlerinin tek başına görevleri dışında aralarında sinerjistik etkileri de içeren bir ilişkiler ağı olduğunu göstermiştir. Total antioksidan kapasite olarak tanımlanan ve tek tek antioksidanların ölçümü yerine plazmada değişik antioksidanların toplam etkilerini gösteren ölçüm yöntemi, son yıllarda pek çok araştırmada kullanılmaktadır (3,11, 57,84,70,82,129,142).

Organizmada serbest radikal oluşma hızı antioksidan savunma mekanizmalarının gücünü aştığı zaman oksidan stres ortaya çıkar (1,108,127). Oksidan stresin kronik karaciğer hastalıklarındaki rolü konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır (11,14,22,25,34,45,63,92,113,130).

Çocukluk çağında özellikle akraba evliliğinin yaygın olduğu ülkemizde, Wilson hastalığı sık görülen bir kronik karaciğer hastalığı nedenidir. Wilson Hastalığı'nda biriken bakırın serbest radikal üretimini artırarak karaciğer hücrelerinde oksidan hasara yol açtığı gösteren çalışmalar mevcuttur (22,45,84,99,111,112,113,138). Bakır, Haber-Weiss reaksiyonunun güçlü katalizörüdür. Bu reaksiyonda hidrojen peroksit, hidroksil radikallerine dönüşür. Hidroksil radikalleri de hızla hücre zarındaki poliansatüre yağ asitleri, tiol içeren proteinler, karbonhidrat ve nükleik asitle reaksiyona girerek hasara neden olur (22,113).

Literatürdeki bilgiler ışığında bu çalışma ile;

1) Wilson hastalığı ve hasta kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarında nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) ölçümü ile oksidan stresin rolünü araştırmak; antioksidan özelliği olan β -karoten, E ve C vitaminlerinin kandaki düzeylerini belirlemek ve serumun total antioksidan kapasitesini ölçmek,

2) Bu veriler ile Wilson hastalığı ve Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarında oksidan stres ve antioksidan durum açısından farklılık olup olmadığını belirlemek,

3) Wilson hastalığı'nda hastalığın kronik hepatit ya da siroz evresinde oluşunun oksidan stres göstergeleri ve antioksidan durum açısından farklılık oluşturup oluşturmadığını araştırmak,

4) Wilson hastalığı'nda düzenli şelasyon tedavisinin oksidan stres ve antioksidan durum üzerine etkisini araştırmak,

Elde edilecek sonuçlarla Wilson hastalığı'nda oksidan stresin rolünü belirlemek ve uygulanan şelasyon tedavisi yanında antioksidan vitaminlerin de yardımcı bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliğini tartışmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

SERBEST RADİKALLER VE OKSİDAN STRES

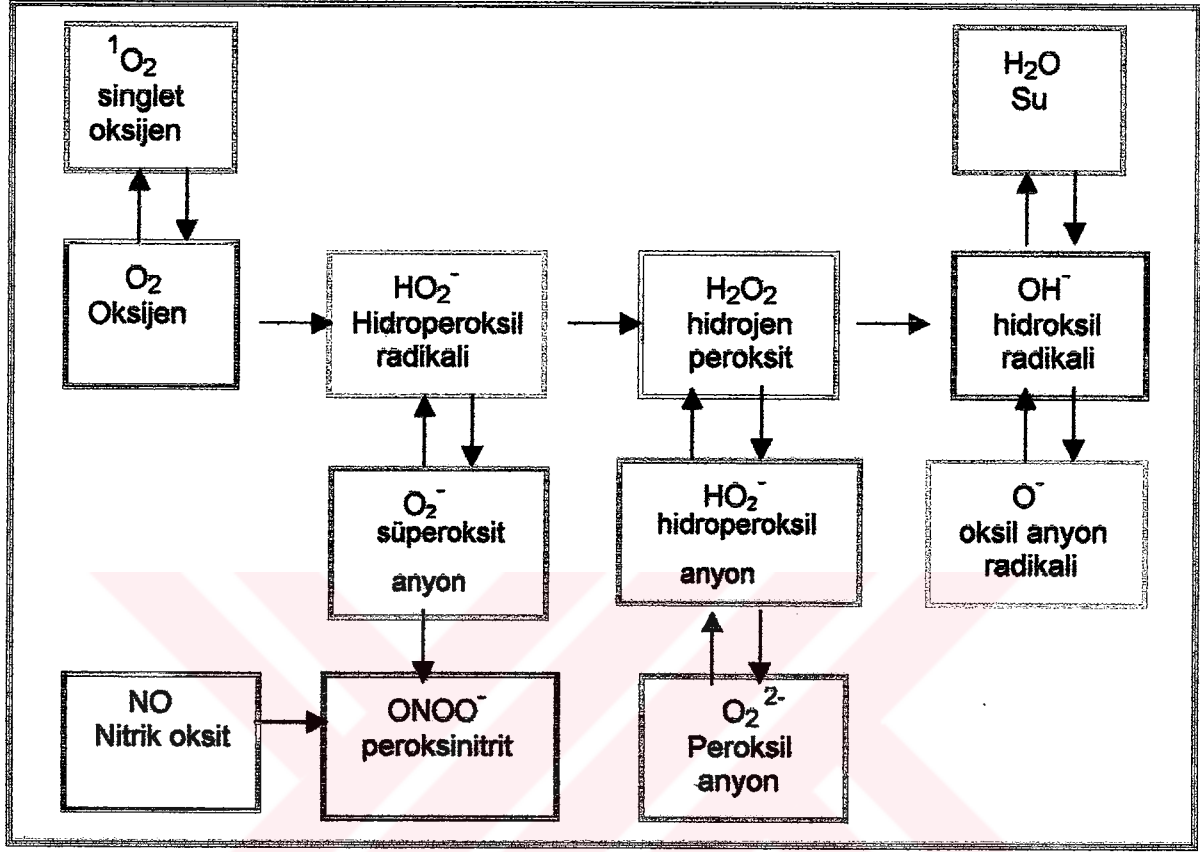
Serbest radikaller; dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, bu yüzden oldukça aktif olan atom ve moleküllerdir. Hücre ve dokularda çeşitli reaksiyonlarla oluşan bu ajanlar hem oksidan hem de redüktan olarak görev yapabilirler. Pek çok hastalıkta doku hasarının patogeneğinde rol alırlar (4,8,49,126,127,132,135).

Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden (O_2) üretilir. Oksijen aslında aerobik hücrelerde oksidatif fosforilasyon yolu ile enerji üretiminde kullanılan zorunlu bir maddedir. Fakat bu zincirden sızan % 1-5'lik oksijen molekülü suya indirgenirken bazı toksik maddeler oluşur. Bu maddeler “reaktif oksijen radikalleri” olarak adlandırılır (126,127,135). Tablo I’ de reaktif oksijen radikallerinin kaynakları (127,132); Tablo II’de birbirine kolaylıkla dönüşebilen reaktif oksijen molekülleri görülmektedir (55) .

Tablo I. Reaktif Oksijen Radikallerinin Kaynakları

<u>Endojen Kaynaklar</u>	<u>Egzojen Kaynaklar</u>
*Elektron transport zincirleme reaksiyonu (mitokondride)	*Diyet (örn.PUFA’ dan zengin diyet)
*Oksidan enzimler ve proteinler (peroksizomlarda)	*İlaçlar (örn.parasetamol)
*Fagositoz (makrofajlarda)	*Hepatotoksinler (örn.CCl ₄ , thioasetamid)
*Küçük moleküllerin otooksidasyonu (sitoplazmada)	*Çevresel ajanlar (örn.radyasyon, sigara)
* Araşidonik asit metabolizması (Hücre zarında)	*Stres *Egzersiz

Tablo II. Reaktif Oksijen Molekülleri



REAKTİF OKSİJEN MOLEKÜLLERİ

a. Süperoksit radikali (O_2^-):

Redüktan ve orta derecede oksidan bir ajan olup, esas önemi hidrojen peroksit'e kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının (Fe , Cu gibi) redüktanı olmasıdır. Hasar yapıcı etkisi belirgin değildir. Hidrojen peroksitin, su ve oksijene yıkılmasında görevli olan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerini inhibe edebilir. (4,127,132).

b. Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Elektron yapısı nedeniyle radikal tanımına uymasa da güçlü bir oksidan ajan olması ve süperoksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşumunu sağlaması

nedeniyle oksijen türevi serbest radikallerle beraber anılır. Hasar oluşturma gücü süperoksit radikali gibi azdır (4,126,127,132).

c. Hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$):

En reaktif radikal türlerindendir. Hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda (Haber-Weiss reaksiyonu) ya da geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) ile meydana gelir (3,4,8,132).

***Haber-Weiss Reaksiyonu:** $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$ (Fe,Cu katalizör)

*** Fenton Reaksiyonu:** $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2} / \text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{+3}$

Tüm hücre yapılarına hasar oluşturma gücü çok yüksektir. Örneğin; hücre zarında lipidlere etki ederek ciddi hasara neden olabilir. Deoksiribonükleik asit(DNA) üzerinde ise mutajenik ve onkojenik olabilir. İstenmeyen toksik etkileri olmasına rağmen üretilmesi normal biyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Fagositoz ve pek çok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak üretilir (4,127,132).

d. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$):

Radikal olmayan reaktif oksijen türlerindendir. Serbest radikal reaksiyonlarında rol alır (4,132)

e. Nitrik Oksit (NO):

Dış yörüngesinde tek elektron içerdiği için bir serbest radikaldir. L-argininden ‘nitrik oksit sentaz enzimi’ (NOS) ile endotel, kan hücreleri, beyin, karaciğer gibi dokularda yapılır (59). Tüm serbest radikaller gibi vücutta normal yapıldığı düzeylerde toksik değildir ve fizyolojik pek çok olayda rol alır (2,39,68,91). Ancak patolojik durumlarda süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitriti (ONOO^-)

oluşturur. Peroksinitrit çok sitotoksik bir ajandır. Bunun protonlanmış şekli olan peroksinitröz asit ise nitrata ayrışırken hidroksil radikali oluşmasına neden olur. Sonuçta lipid peroksidasyonu meydana gelir. Tablo III' de NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü görülmektedir (2,39,59,68,77,123,132) .

Tablo III. Nitrik Oksit'in Fizyolojik ve Patolojik Olaylardaki Rolü

FİZYOLOJİK	PATOLOJİK
Siklooksijenaz aktivasyonu	Mitokondrial solunum inhibisyonu
Normal damar tonusu	Hipertansiyon
Trombosit adezyonunun engellenmesi	İskemi-reperfüzyon hasarı
Kısa süreli vazodilatasyon	Septik şokta hipotansiyon
Sinir iletimi	Felçte nörodejenerasyon
Mukoza korunması	Ülseratif kolit
Penis ereksiyonu	Priapizm
Makrofaj aracılı tümör hücresi öldürülmesi	Kronik inflamasyonda sitotoksisite

Nitrik oksitin yarı ömrü çok kısa olup hızla son ürünleri olan nitrat (NO_3) ve nitrite (NO_2) döner. Bu nedenle ölçümlerde doğrudan NO ölçümü yerine bu son ürünlerin düzeylerinin ölçümü yapılır (13,30,76,133).

Kronik karaciğer hastalıklarında inflamatuvar yanıtta önemli rol oynayan ve yüksek düzeyde bulunan tümör nekrozis faktör alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interlökin 1 (IL-I), interlökin 6 (IL-VI) ve interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) gibi sitokinlerin uyarıları ile NO oluşumunun ve plazma nitrat ve nitrit düzeylerinin arttığı görülmüştür. Bu nedenle

NO' nun, inflamatuvar uyarılara karaciğerin verdiği cevabın oluşmasında aracı olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan NO sitotoksik özelliklere sahiptir ve hücre hasarı oluşturmaktadır (50,51,58,102).

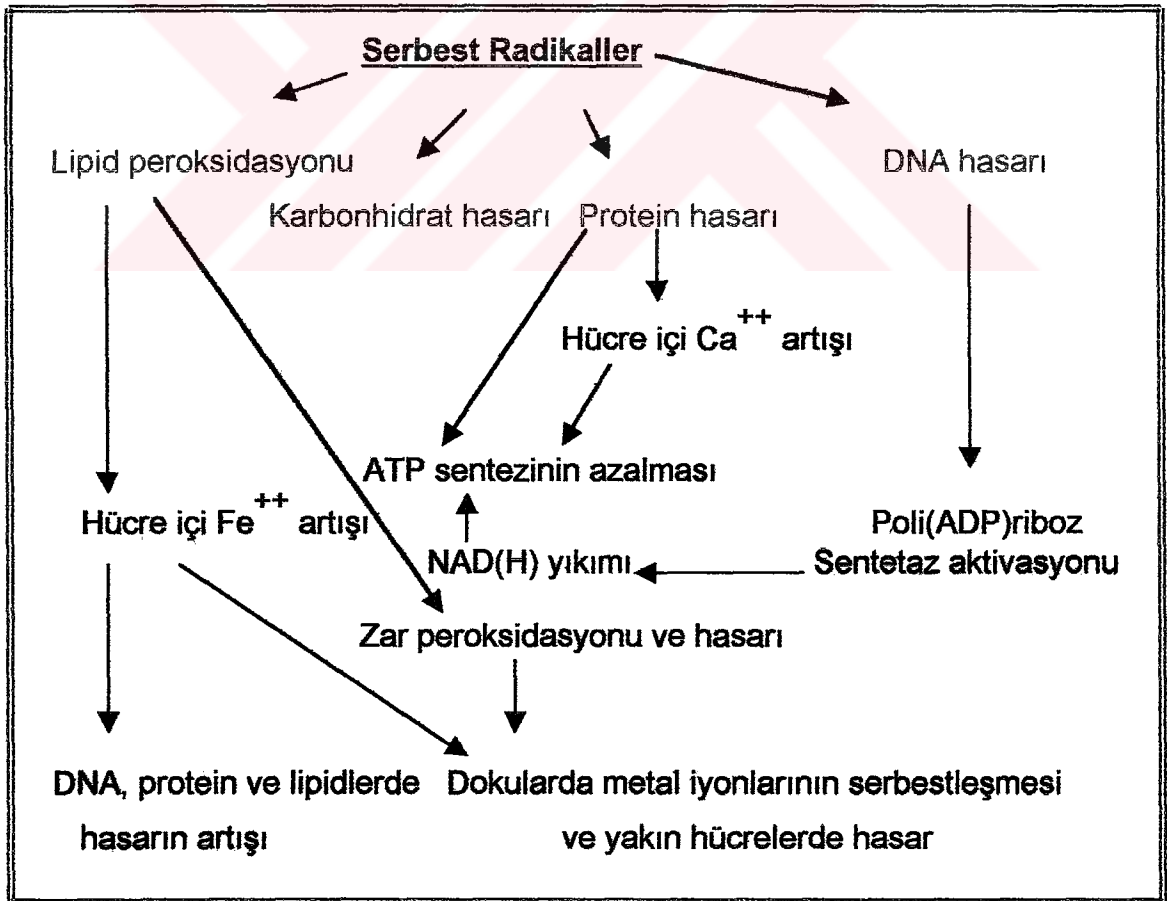
Yapılan pek çok insan ve hayvan çalışmasında siroz ve/veya portal hipertansiyonda artmış NO ve nitrat düzeyleri gösterilmiştir(7,18,26,29,46,71,85,125).

Serbest radikallerin hasar oluşturma mekanizmaları:

Serbest radikallerin hücre hasarı oluşturma mekanizmaları çok çeşitli olup, radikal saldırısından en fazla lipidler olmak üzere tüm biyomoleküller zarar görebilir. Radikaller; DNA, karbonhidrat ve protein hasarı ile enzim fonksiyonlarında bozulma ve hücre organel hasarına yol açabilir. Ancak en önemli hasar yolu lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan, zar yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonu ile karakterli reaksiyon zinciridir. Lipid peroksidasyonu zar yapısına doğrudan, diğer hücre yapılarına ise reaktif aldehitlerin üretimi yolu ile zarar verebilir (8,14,32,40,47,67,111,126,127,132). Olay zincirleme bir reaksiyon şeklinde yenilenmesinden dolayı oldukça zedeleyicidir (4). Lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın, hidroksil radikali olduğu bilinmektedir (126). Hücre zarı, serbest radikallerden etkilenen PUFA' lardan çok zengindir. PUFA' ların oksitlenmesiyle "yağ asit radikali" ve buna oksijenin eklenmesiyle de "yağ asidi peroksi radikali" ortaya çıkar. Yağ asidi peroksi radikali zincir reaksiyonunun taşıyıcısıdır ve diğer PUFA moleküllerini okside ederek lipid hidroperoksitlerin meydana gelmesine neden olur (4). Lipid hidroperoksitlerin zarda birikimi sonucu zar fonksiyonları bozulur ve hücre büzülür (4). Olay lipid hidroperoksitlerin

sitotoksik olan aldehit ve diğer karbonil bileşiklere hidrolizi ile sona erer. Lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkan aldehitlerden en önemlileri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinoneal (4-HNE)'dir (4,84,126).

Protein ve nükleik asitler PUFA' lara göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Serbest radikallerin etkisi sonucu proteinlerin yapısı bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Enzimler de protein yapısında olduğunda enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelir. Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek mutasyonlara neden olabilirler (32,40). Şekil 1' de serbest radikallerin lipid peroksidasyonu ve diğer yollarla hasar oluşturma mekanizmaları görülmektedir (32).



Şekil- 1. Serbest radikallerin hasar oluşturma mekanizmaları

Serbest radikal ölçüm metotları:

Direkt yöntemlerin zorluğu nedeniyle daha çok öncül moleküllerin ya da reaksiyon ürünlerinin ölçümü tercih edilir. Lipid peroksidasyonuna bağlı yıkımı ölçmek için kullanılan başlıca yöntemler; lipid hidroperoksitlerin konjuge dienler ve peroksil radikaller gibi öncüllerinin ölçümü, lipid hidroperoksitlerin ölçümü ve alkanlar ve aldehitler (MDA veya 4-HNE) gibi yıkım ürünlerinin ölçümüdür. Bunlar içinde en çok kullanılanı MDA' dır (36,101,112,127).

MDA' nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek MDA-TBA bileşiğini oluşturması ve oluşan bu kompleksin ölçümü esasına dayanan tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) yöntemi günümüzde kolaylığı ve duyarlılığı nedeniyle lipid peroksidasyonu göstermede en çok kullanılan metottur. Bu reaksiyon temeline dayanan pek çok MDA ölçüm yöntemi vardır (4,36). Spektrofotometrik ya da florometrik ölçümler en sık kullanılan yöntemler olsa da en hassas olanı yüksek performanslı likid kromatografi (HPLC)' dir (3,14,26,101,135).

ANTIÖKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreler de bazı koruyucu mekanizmalar içerirler. Bu savunma mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu önleyerek (metal şelatörleri ve antioksidan enzimler); bir kısmı ise zincir kırma yolu ile oluşmuş radikalın zararlı etkilerini engelleyerek (E vitamini, β -karoten, ürik asit, glutatyon) görev yaparlar. Bu görevleri yapan maddelerin hepsine birden antioksidanlar denir (8,40,82,92,105,110). Antioksidanların başlıca etkileri şunlardır :

1-Radikal oluşumunun sınırlandırılması: Transferrin, albümin, seruloplazmin ve haptoglobülin radikal oluşumunu şelasyonla sınırlandırır.

2-Radikal reaksiyonlarının sonlandırılması: E vitamini lipid peroksidasyonunu sonlandırır.

3-Oluşan radikallerin detoksifikasyonu: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-P_x) bu grupta yer alır.

4-Oksidatif olarak hasarlanmış biyomoleküllerin tamiri ve uzaklaştırılması: Hasarlı nükleik asitler spesifik enzimlerle tamir edilir, hasarlı proteinler ise proteolitik enzimlerle uzaklaştırır (136).

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (136):

1-Yapılarına göre:

- a. Enzimatik antioksidanlar
- b. Enzim dışı antioksidanlar

2-Kaynaklarına göre

- a.Endojen antioksidanlar
- b.Egzojen antioksidanlar

3-Çözünürlüklerine göre:

- a.Sıvı faz (non-membranöz)
- b.Lipid faz (membranöz)

4-Yerleşimlerine göre:

- a.Hücre içinde bulunanlar
- b.Plazma ve diğer hücre dışı sıvılarda bulunanlar

Tablo IV. Endojen ve egzogen antioksidanlar

Endojen Antioksidanlar	Egzogen Antioksidanlar
A-Enzimatik antioksidanlar *Sitokrom oksidaz sistemi *Süperoksit dismutaz *Katalaz *Glutasyon peroksidaz B-Enzim dışı antioksidanlar 1-Lipid faz * α -tokoferol:E vitamini * β -karoten:A vitamini öncüsü *Ubikinon 2-Sıvı faz *Askorbik asit:C vitamini *Ürat *Sistein *Seruloplazmin *Transferrin *Ferritin *Albümin *Glutasyon	*Non steroid antiinflamatuvarlar *Mannitol *Albümin *Allopurinol *Glutasyon *Seruloplazmin *Desferroksamin *Flavonoidler *Bromokriptin *Koezim Q

ANTİOKSİDAN VİTAMİNLER

Vitamin C (askorbik asit)

Güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet O_2 ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sıvı fazda bulunmasına karşın lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek zarları oksidan hasara karşı korur (40,105,109,122,136). E vitaminini (α -tokoferol) rejenere ederek tokoferoksil radikalinin α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile beraber etkin bir şekilde antioksidan etki gösterir. Ayrıca antiproteazların oksidan maddelerle inaktive olmasını engeller (22,111,122,127,136).

Askorbik asit redoks koşullarına bağlı olarak aynı zamanda radikal de oluşturabilir. Fizyolojik koşullarda ve yüksek konsantrasyonlarda antioksidan iken çok düşük konsantrasyonlarında prooksidan özelliği ortaya çıkar. Ferri demiri (Fe^{+3}) indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demire (Fe^{+2}) dönüştürür. Böylece süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu özelliği de C vitamininin prooksidan olmasını sağlar (105,117, 122,136).

Sağlıklı dokularda askorbik asit; dehidroaskorbik asite, dehidroaskorbik asit de tekrar askorbik asite döner. Eğer dehidroaskorbik asitten askorbik asite rejenerasyon olmazsa dokunun antioksidan kapasitesi azalabilir ve oksidan hasar oluşur (40,76,89,122).

Vitamin A

Doğada 600' ün üzerinde karotenoid bulunmaktadır ancak bunun 50 kadarı A vitamini (retinol) öncüsüdür. A vitamininin ön maddesi olan β -Karoten bu karotenoidlerin başlıcasıdır (11,47,122).

Büyüme, görme, üreme, epitel farklılaşması ve immün sistemde önemli görevleri olan A vitamini, serbest oksijen radikallerini temizleme özelliği nedeniyle etkili bir antioksidandır. Lipid fazda olup zincir kırıcı olarak etki gösterir (11,16,17,105).

Hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korur (111,136):

- 1-Flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama
- 2-Singlet O_2 'i baskılama
- 3-Peroksil radikallerinin temizlenmesi

Son derece güçlü singlet O_2 temizleyicisi olan A vitamini; hidroksil, peroksi ve alkoksi radikalleri ile de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyonunu engeller. Ayrıca hücre DNA' sının korunmasında ve fagositik hücrelerin otooksidatif hasardan korunmasında rolü olduğu gösterilmiştir (34,109,142). Antioksidan özelliği; antikanser, immün sistemi uyarıcı görevlerinde ve koroner kalp hastalığı riskini azaltma gibi etkilerinde önemli yer tutar. Düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu engellemede E vitamininden iki kat daha güçlüdür (11,98,105).

A vitamininin antioksidan görevi düşük oksijen basınçlı ortamlarda ve düşük konsantrasyonlarda daha belirgindir. Diğer antioksidanlara yardımcı olarak onların (özellikle E ve C vitaminleri) etkilerini tamamlar (109,142).

Vitamin E

Farklı biyolojik aktiviteye sahip tokoferol ve tokotrienol denilen iki sınıf içerir. En güçlü üyesi α -tokoferol olup, dokulardaki vitamin E'nin %90' dan fazlasını içerir. E vitamini ile eş anlamı olarak kullanılır (82,105,138).

E vitamini plazmada ve tüm hücre zarlarında bulunur. Lipid fazda, serbest radikal temizleyicisi gibi davranan önemli bir antioksidandır (24,70,105,109,115,130). Dolaşımdaki lipoproteinlerin korunmasında ve hücre zarlarının görevini doğru yapmasında çok önemli görevleri vardır. Başlıca rolü, radikalleri daha az aktif şekillere dönüştürerek zarları lipid peroksidasyonundan korumaktır. Peroksidasyon zincirini kırarak ilk savunma hattını oluşturur (,136,138). Süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet O_2 ' i, lipid peroksitlerini ve diğer radikalleri indirger, NO ile de reaksiyona girebilir (24,25,40,70,111,122,127,136).

Serbest radikali ortadan kaldırırken kendisi de göreceli olarak kararlı ve normal şartlarda inaktif olan tokoferoksil radikaline döner (105,109,127). Oluşan reaktif olmayan E vitamini radikali, glutatyon veya C vitamini ile tekrar aktif hale getirilir (35,70,114,127)

Diğer antioksidanlar

Seruloplazmin, Ferritin, Transferrin:

Demir(Fe) ve bakır(Cu) iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılarak reaktivitesi az olan radikallerin daha reaktif şekillere dönüşmesini hızlandırırlar (Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları) (40,49,136). Bu etkilerini sadece serbest halde iken gösterebilirler. Çeşitli moleküllere özellikle de proteinlere bağlı iken radikal reaksiyonlarında yer almazlar. Bu nedenle Fe ve Cu depolanmasında ve taşınmasında rol alan proteinlerin (seruloplazmin, ferritin, transferrin) antioksidan savunmaya önemli katkıları vardır (122,136).

Enzimatik antioksidanlar:

a. Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikaline karşı ilk aşama savunmadan sorumludur. Süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayarak ortadan kalkmasını sağlar (105,136).

b. Sitokrom c oksidaz: Mitokondride solunum zincirinin son basamağında yer alan ve süperoksit radikalini suya dönüştüren bir enzimdir (105,136).

c. Katalaz: Hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya indirger (105,136).

d. Glutatyon peroksidaz (GSH-P_x): En önemli antioksidan enzimdir.

Hidrojen peroksiti, indirgenmiş glutatyonu (GSH) oksitlenmiş glutatyon (GSSG) çevirmede kullanmak üzere ortadan kaldırır (105,127,136).

Total Antioksidan Kapasite

Antioksidan savunma sistemleri özgül etkiler dışında bir ortak etkiler ve ilişkiler ağı oluştururlar (92). Örneğin; vitamin C ve glutatyon vitamin E' nin rejenerasyonunu sağlayarak (11,57,70,82,84,129,142), ürik asit vitamin C' nin otooksidasyonunu engelleyerek sinerjistik etki gösterirler. Truscoh ve Bölm' ün çalışmalarında ise karotenoidlerin vitamin E ve C ile ilişkisi gösterilmiştir: Karotenoidler vitamin E radikalini ortadan kaldırırken, C vitamini de karotenoid radikalini uzaklaştırır (11, 26, 142).

Böylece antioksidan durumu göstermede tek tek antioksidanların ölçümü yanında değişik antioksidanların ortak etkilerinin ölçümüne yani "total antioksidan kapasite"nin bilinmesine ihtiyaç doğar. Sonuç olarak plazmanın total antioksidan kapasitesinin her antioksidanın tek başına etkilerine ek olarak değişik antioksidanlar arasındaki ilişkilere bağlı olduğu söylenebilir (84, 92, 142).

Çeşitli antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri vardır. TRAP (total radikal tutucu parametre), TEAC (trolloks eşdeğer antioksidan kapasite), ORAC (oksijen radikal absorblama kapasitesi) bunlardan bazılarıdır. Çoğu ölçüm yöntemi serbest radikallerin çeşitli prooksidanlar kullanılarak engellenmesine dayanır (54,57, 78,83)

Oksidan stres

Organizmada normal şartlarda da oluşan serbest radikal üretimi değişik savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılır. Bu nedenle patolojik bir durum oluşmaz (1,108). Ancak biyolojik denge bozulduğunda , yani serbest radikal oluşma hızı savunma mekanizmalarının gücünü aştığı zaman oksidan stres ortaya çıkar (77,79,84,93). Kısaca serbest radikallerin hücre fonksiyonlarındaki net etkisi radikal ürünleri ile koruyucu sistemler arasındaki dengeye bağlıdır.

ÇOCUKLUK ÇAĞI KRONİK KARACİĞER HASTALIKLARI

Kronik karaciğer hastalıkları çocukluk çağında kronik hepatit ya da siroz şeklinde karşımıza çıkar (10, 107,119).

Kronik hepatit, karaciğerdeki inflamasyon ve nekrozun 6 aydan daha fazla sürdüğü duruma verilen genel bir isimdir. Siroza ilerleme gösterebilir (10,107).

Siroz, karaciğerde inflamasyon ve nekrozu takiben yaygın fibrozis ve rejenerasyon nodüllerinin oluşması ile karakterlidir. Morfolojik ve etyolojik olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir (10,107,119).

Morfolojik olarak :

1-Mikronodüler siroz

2-Makronodüler siroz

3-Mikst tip siroz

Makronodüler siroz 5 cm' e kadar ulaşabilen değişik büyüklüklerdeki nodüller ve geniş fibröz septalarla karakterlidir. Viral hepatitler sonrası oluşan siroz ve Wilson sirozu bu gruba girer (10).

Kronik hepatit ve sirozların sınıflandırmasında genellikle etyolojik faktörler gözönüne alınır (tablo V) (10,107,119).

TABLO V. Çocukluk çağında kronik karaciğer hastalığı nedenleri

-Genetik-metabolik nedenler	- Hepatit virüsleri (B,C,D)
Wilson hastalığı	- Otoimmün nedenler
Alfa 1 antitripsin eksikliği	- Pasif venöz konjesyon
Tirozinemi	Budd-chiari sendromu
Niemann-Pick hastalığı tip 2	Konstrüktif perikardit
Glikojen depo hastalığı tip 4	Biliyer sirozlar
Kistik fibroz	-İlaçlar
Galaktozemi	-Kriptojenik

WILSON HASTALIĞI

Wilson hastalığı, bakırın karaciğer başta olmak üzere beyin, kornea, böbrekler nadiren de endokrin organlar ve iskelette birikimi ile karakterli bir hastalıktır. Otozomal resesif geçiş gösterir. 13. kromozomdaki bakır taşınmasından sorumlu p-tip adenoazin trifosfatazi (p-tip ATPaz) kodlayan gendeki bozukluk sonucu bakırın karaciğer hücrelerinden safraya salınımı ve seruloplazmine bağlanması bozulmuştur. Doğumda normal olan vücut bakır içeriği sonradan safra ile atılan bakır miktarının azalmasına bağlı olarak artar. Bakır önce karaciğer olmak üzere diğer dokularda da birikir ve hastalığın klinik belirtileri ortaya çıkar (9,15,20,33,67,87,97,116,118,138).

Hastalığın prevalansı 1/30.000 , heterozigot taşıyıcı sıklığı ise 1/90 olarak tahmin edilmektedir (45,67,134,145).

PATOGENEZ:

Bakır; hücre solunumu, demir metabolizması, pigment oluşumu, nörotransmitter ve peptit biyosentezi, kollajen doku sentezi ve antioksidan savunma sisteminde rolü olan esansiyel bir elementtir. Yüzden fazla metalloenzimin yapısında yer alır. Serumda %95' den fazlası seruloplazmine bağlı olarak, % 5 ise albümin ya da histidin gibi aminoasitlere bağlı olarak taşınır (20,67,112).

Karaciğer bakır dengesini sağlayan başlıca organdır (15,20,67). Bakır dengesi başlıca safra atılımı tarafından belirlenir. Safra ile bakır atılımının düzenlenmesi 13. kromozomda yer alan "Wilson hastalığı geni (WD geni)" tarafından yapılır. Bu gende çok sayıda tanımlanmış olan mutasyonlar sonucu "WD proteini" denilen ve bakır taşınmasından sorumlu p- tip ATPaz' ın fonksiyon bozukluğu gelişir (20,45).

WD proteini mitokondri zarında yerleşmiş olup görevi bakırın seruloplazmine bağlanması ve hücre dışına taşınmasıdır. Bu proteinde mutasyonların yol açtığı bozukluklar, mitokondride bakır içeriğinin artması ile sonuçlanır. Safraya salınımının azalmasıyla birlikte, bakır karaciğer hücrelerinde giderek artar ve daha sonra ayrıntılı şekilde bahsedilecek mekanizmalar ile serbest radikal üretimine ve hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur (9,45,69,118).

KLİNİK:

Wilson hastalığı; çocuk, adolesan ve genç erişkinlerin hastalığı olup, 6 yaşından önce klinik bulgu vermesi nadirdir (134,144). Klinik ilerleyicidir ve hastalık dört evrede incelenebilir: Başlangıçta karaciğer hücresi sitozollerinde bakır birikimi olur, hastalarda klinik bulgu yoktur (evre I). Sitozoller doyduğu zaman bakır lizozomların içine bazen de dolaşıma salınır. Dolaşıma salınma birçok hastada yavaş gelişir ve çoğu hastada klinik siliktir. Eğer bakır dolaşıma hızlı dağılırsa hastalar fulminan karaciğer yetmezliği veya akut intravasküler hemoliz bulgularıyla gelebilir (evre II). Lizozomlarda bakır birikimi sonucu karaciğer hastalığı bulguları, izleyerek karaciğer dışı dağılım sonucu sinir sistemi, göz ve böbrek bulguları ortaya çıkar (evre III). Eğer hastalar üçüncü evrede tanınırsa ve geri dönüşümsüz organ hasarı henüz meydana gelmemiş ise tedaviden iyi yanıt alınabilir. Ancak depolanma hızla gelişirse hastalık da hızla ilerler (evre IV) (139).

Tüm olguların % 42' sinde karaciğer, % 34' ünde nörolojik, % 10' unda da psikiyatrik bulgular başlangıç yakınmaları olabilir. Hematolojik, endokrin, böbrek bulguları % 10' dan az vakada görülür (139).

Karaciğer tutulumu :

Çocukluk çağında en sık başlangıç şeklidir. Ortalama 10-13 yaşlarında ortaya çıkar. Hiçbir yakınması olmayan hastada hafif karaciğer fonksiyon testi yüksekliğinden, akut-kronik hepatit, siroz ve fulminan karaciğer yetmezliğine kadar tüm karaciğer hastalığı şekilleri görülebilir. Ancak olguların çoğunda seyir kronik olup post nekrotik siroz ile sonuçlanır (20,67,139,146).

Merkezi sinir sistemi tutulumu:

Bu bulgular genellikle adolesan ve genç erişkin dönemde ortaya çıkar. Nörolojik bulgular bazal ganglionlar, serebral korteks, serebellum ve daha az oranda beyin sapının tutulmasından kaynaklanır. Erken nörolojik bulgular; konuşma bozukluğu, tremor, inkoordinasyon sorunlarını (yürüme güçlüğü, ataksi) içerir. Geç nörolojik bulguların gelişimi ise erken tanı ve düzenli tedavi ile önlenabilir. Distoni, spastisite, rijidite ve epilepsi geç nörolojik bulgulardır (9,20,67,87,103,118,139).

Diğer klinik belirtilerin çıkmasından 2-3 yıl önce hastalarda kişilik ve davranış değişiklikleri görülebilir. Bu bulgular uyarıcı olmalıdır. Depresyon, psikoz, bilişsel ve algısal bozukluklar; okul ve iş başarısındaki azalmada önemli rol oynar (19,20).

Göz bulguları:

Kayser-Fleischer halkası 1-3 mm çapında,yeşil-sarı veya kahverengi renkte bir halkadır. Kornea çevresinde yerleşir. Nörolojik tutulumlu olguların hemen hepsinde vardır. Bakır ve sülfürden oluşan elektron yoğun granüller içerir. Normal çıplak gözle görülmesi zordur, genellikle yarık lamba ile muayeneye ihtiyaç duyulur. (67,87,103). Hastalığın diğer klinik belirti ve bulguları (9,67,87,118,139) tablo VI' da özetlenmiştir:

Tablo VI. Wilson Hastalığı' nın klinik belirti ve bulguları

1-Hepatobilier: Asemptomatik hepatomegali, akut-kronik hepatit, siroz, fulminan karaciğer yetmezliği
2-Nöropsikiyatrik: Tremor, distoni, dizartri, spastisite, duygusal değişiklikler, okul ve iş başarısında azalma
3-Göz: Kayser-Fleischer halkası
4-Hematolojik: Coombs(-) hemolitik anemi
5-Renal: Fanconi sendromu, proksimal ve distal renal tübüler asidoz, renal yetmezlik
6-Romatolojik: Artrit, osteoporoz, raşitizm, kemik mineralizasyonu, osteokondrit, eklem çevresi ve içi kalsifikasyon
7-Dermatolojik: Lokalize-sistemik olarak deri hiperpigmentasyonu, akantozis
8-Kardiyak: Konjenital kalp yetmezliği, aritmi, ortostatik hipotansiyon, valsava manevrasına anormal yanıt ile karakterli otonomik fonksiyon bozukluğu
9-Endokrin: Hipoparotroidi, hipotroidi

TANI:

Wilson hastalığı' nın erken tanısı önemlidir çünkü bakırın oluşturduğu hasarın erken tedavi ile azaltılması mümkün olabilir (20,87). Özellikle aile taraması ve henüz semptomsuz hastalar ile taşıyıcıların erken tespiti bu nedenle çok önemlidir (104,131,145). Tanıda tek test kullanılmaz. Hikaye,fizik muayene, yarık lamba muayenesi yanında tanı amacı ile kullanılan laboratuvar yöntemleri şunlardır:

1-Serum seruloplazmin düzeyi: Serumdaki bakırın %95'den fazlasını taşır.Hastaların çoğu hastada düşük olup, bazı olgularda (%10-25) normal değerler saptanabilir.

2-Serbest serum bakırı: Total serum bakırının % 5- 10' u olup aminoasit ve albüminlere gevşekçe bağlıdır. Tedavi edilmeyen Wilson hastalarında yükselir (67,87).

3-Total serum bakırı: Seruloplazmine bağlı bakır ile serbest serum bakırının toplamını gösterir. Çoğu hastada seruplazmin düzeyini yansıtır ve düşüktür (67,84,87).

4-İdrar bakır atılımı: Normal kişilerde 24 saatlik idrarla atılan bakır miktarı 70 $\mu\text{g/gün}$ ' ün altındadır. Wilson hastalığı' nda ve karaciğerde bakır depolanması ile karakterli diğer hastalıklarda ise genellikle 100 $\mu\text{g/gün}$ ' ün üzerindedir. İdrar bakır atılımının seri tayinleri en iyi izlem testidir (84).

5-Biyopsi ve karaciğer bakır konsantrasyonu: Tanı için altın standarttır (20,117). Biyopside karaciğer hücrelerinin içinde değişik dağılımlarda bakır depolanmalarının kanıtları ve mikronodüler siroz görülür. Normal kişilerde bakır miktarı 1 gram kuru karaciğer dokusunda 100 μg ' ın altındadır. Wilson hastalarında bu miktar 250 μg ' ın üzerindedir. (9,20,67,87,117,118).

6-Seruloplazmine radyoaktif bakır bağlanması: Ağızdan işaretlenmiş bakırın yeni sentezlenen seruloplazmine bağlanmasındaki azalmanın görülmesi özellikle normal seruloplazmin seviyesine rağmen Wilson hastalığı'ndan şüphelenilen hastaların tanısında kullanılabilir (67,87).

TEDAVİ:

Homozigot tüm Wilson hastaları yaşam boyu tedaviye ihtiyaç duyarlar. Uygun tedavi ile semptomsuz hastaların bu şekilde kalması; semptomatiklerde ise bulguların gerilemesi sağlanır. Tedavi düzenli uygulanmazsa hastalık karaciğer yetmezliği ve ölümle sonuçlanır (19,87,139).Tedavide kullanılan başlıca ajanlar:

1-Penisilamin: Tedavide ilk seçenek ilaç olup, etkisini idrarla vücuttan bakır atılımını sağlayarak yapar. Yan etkileri; hipersensitivite reaksiyonları, nefrotik sendrom, Good Pasture Sendromu, ilaca bağlı lupus, kolestaz, myastenia gravis, serum Ig A düşüklüğü, polimyozit, trombositopeni, agranülositoz ve aplastik anemiye içerir (9,19,87,118,139,140).

2-Trientin: Özellikle penisilaminin yan etkileri gözlenen hastalarda alternatif şelasyon ajanı olarak kullanılır. İdrarla bakır atılımını sağlayıcı etkisi penisilaminden daha azdır. Yan etkileri nadir olup tedavinin ilk birkaç haftasında proteinüri veya kemik iliği baskılanması olabilir. Lupus nefriti ve serum demir düzeylerinde azalma bildirilmiştir (19,87,139).

3-Çinko: Tedavide üçüncü ajan olarak ve penisilamin ile trientinin kullanılmadığı hastalarda kullanılır. Dışkı ile bakır atılımını artırarak etki gösterir. En önemli yan etkisi gastrointestinal irritasyondur. Ayrıca bakteriyel fagositoz ve kemotaksiste değişiklikler yapabilir. Mikrositik anemiye yol açtığı bildirilmiştir (19, 21, 87,139,140).

4-Tetratiomolibdat: Özellikle nörolojik tutulumu olan Wilson hastalarında başlangıç tedavisinde kullanılabilir (19,20,87,139).

KRONİK KARACİĞER HASTALIĞI-OKSİDAN STRES İLİŞKİSİ:

Kronik karaciğer hastalıklarında oksidan stresin rolü ile ilgili yetişkinlerde ve deneysel hayvan modellerinde yapılmış çok sayıda çalışma vardır (11,14,22,25,34,45, 63,92,116,130). Karaciğerde serbest radikallere bağlı olarak oluşan hasar, deneysel çalışmalarda sıçan karaciğerlerinde karbon tetraklorür (CCl₄) ,demir ve bakır gibi prooksidan ajanlar ile siroz oluşturularak gösterilmiştir (25,91). Yetişkinlerde özellikle hepatit virüsleri, alkol gibi nedenlere bağlı sirozlar ile

ilgili yayınlanmış makale sayısı fazladır (14,34,98). Çocuklarda bu konuda yapılmış çalışma sayısı azdır (84,88).

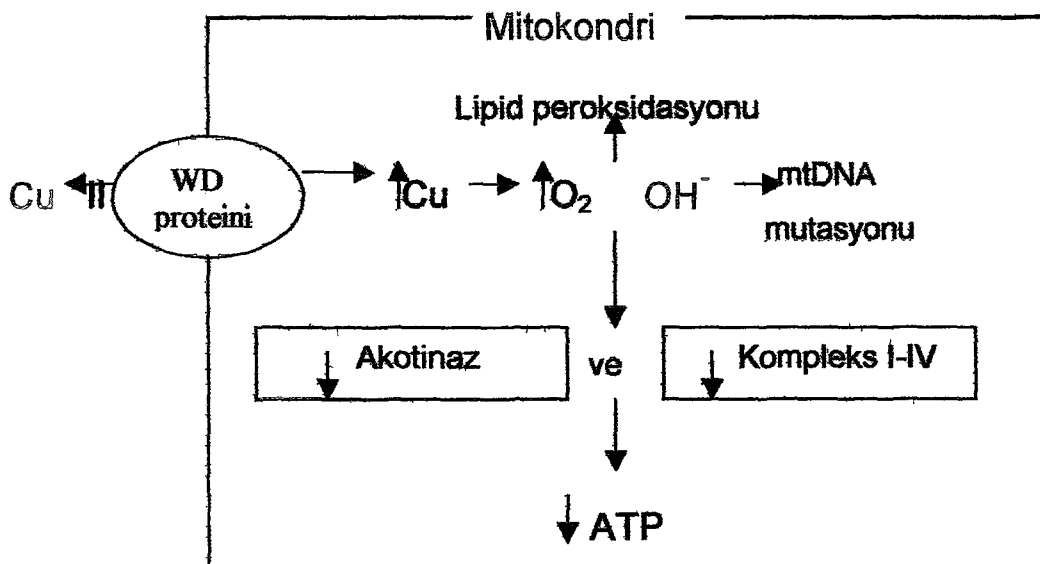
Serbest radikallerin karaciğerde oluşturduğu hasarın mekanizması çok çeşitlidir. Ancak pek çok kronik karaciğer hastalığında asıl mekanizma lipid peroksidasyonudur. Birçok yayında bunu destekleyen veriler elde edilmiştir (14,28,56,62). Radikaller, lipid peroksidasyonu yolu ile karaciğer hücrelerine zarar verebildiği gibi; DNA, protein, karbonhidratlar, enzimler ve değişik hücre organellerini etkileyerek de hücre fonksiyonlarını bozarlar (8,32,47,49). Serbest radikallerin karaciğer hücresinin mitokondri, mikrozom, lizozom ve hücre zarında yaptığı değişiklikler hücre düzeyinde gösterilmiştir. Bu değişiklikler; hücre zarının geçirgenlik fonksiyonlarında bozulma, mitokondri DNA' sında (mt DNA) delesyonlar ve kalsiyum alımının değişmesi, lizozomlardan hidrolitik enzimlerin salınması, golgi cisimciğinden anormal lipoprotein sentezi ve endoplazmik retikulumun bazı enzimatik fonksiyonlarındaki bozulmayı içerir. Serbest radikallerle oluşturulan bu hasarlar doku düzeyinde yağlanma, nekroz ve fibrozis gibi farklı şekillerde karşımıza çıkar (90).

Kronik karaciğer hastalıklarının ve fibrozisin patogenezinde inflamatuvar sitokinlerin rolü olduğu bilinmektedir. Hasara uğrayan karaciğer hücrelerinden salınan lipid peroksidasyon ürünleri (MDA ve 4-HNE gibi); yıldız hücrelerinden doğrudan ya da inflamatuvar hücreler tarafından üretilen sitokinler aracılığı ile fibroblast ve lipositlerin kollajen sentezini arttırmasına neden olabilir (25,115,116). Böylece artmış oksidan stresin karaciğerde fibrojenezisi uyardığı ve siroz gelişimini kolaylaştırdığı görülür (25,88). Ayrıca sitotoksik oksijen radikallerinin üretiminin,

hücre içi kalsiyum seviyelerini değiştirdiği ve bunun da hücre hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (116).

Kronik karaciğer hastalıklarında oksidan stresin rolünü göstermek için yapılan çalışmalarda serum ve karaciğer dokusunda MDA ve çeşitli antioksidan vitaminlerin ölçümü sıkça kullanılmıştır. Örneğin; viral hepatitli hastalarda MDA'nın yükseldiği, antioksidan kapasitenin azaldığı (34), çeşitli siroz gruplarında vitamin E ve β -karoten düzeylerinin düşük olduğu (98), alkolik karaciğer hastalığı olan hastaların serum ve karaciğer dokusunda β -karoten seviyelerinin düşük olduğu (71), hemokromatoziste MDA'nın arttığı ve her üç antioksidan vitaminin de azaldığı gösterilmiştir (143). Sirozlu hastalarda NO'nun siroz komplikasyonlarının meydana gelmesindeki rolü ile ilgili de pek çok çalışma vardır (7,18,26,29,46,71,85,125,128). Ancak siroz öncesi bir durum olan kronik hepatitli hastalarda NO ile ilgili çalışma sayısı azdır (58).

Genetik ve metabolik nedenli bir kronik karaciğer hastalığı olan Wilson hastalığının patogeneğinde oksidan stresin rolü olduğu bilinmektedir(Şekil-2) (33).



Şekil- 2 Wilson hastalığının patogenezi

Wilson hastalığı' nda, özellikle mitokondride biriken bakır, prooksidan bir elementtir. Haber-Weiss reaksiyonunu katalize eder. Bu reaksiyonda hidrojen peroksit, hidroksil radikallerine döner ve mitokondride lipid peroksidasyonuna, enzim aktivitelerinin değişmesine ve mitokondri DNA' sında delesyonlara neden olur (33,45,69,84,116).

Bakır toksisitesinde oksidan hasarın asıl hedefinin mitokondri olduğu gösterilmiş ve mitokondride oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler çeşitli deneysel hayvan çalışmaları ile ispatlanmıştır (22,45,116). Mitokondri ve mikrozomların yapısında yüksek oranda bulunan doymamış yağ asitleri bu organellerin peroksidasyona hassas olmalarının nedenidir . LEC (Lec Cinnamon Evans) sıçanlar ve diğer bakır fazlalığı olan hayvan modellerinde hücre içinde artan demir ve bakır gibi metallerin lipid peroksidasyonunu arttırdığı görülmüştür. Bu yol ile bakırın, mitokondride oksidatif fonksiyonları özellikle metaller tarafından uyarılan oksidan stresten sorumlu sitokrom c oksidaz aktivitesini ve evre III solunumu bozduğu belirtilmektedir (69,113). Mitokondri etkilendiğinde en erken oluşan histolojik değişiklikler ise makrovakuoler ve/veya mikroveziküler yağlanmadır (69). Gu ve arkadaşları (45), Wilson'lu hastaların karaciğer mitokondrisindeki azalmış enzim aktivitelerini ve enerji metabolizmasını göstermişlerdir. Enzim özelliklerinin incelenmesi sonucunda serbest radikallerin bakır aracılı olarak bu hastalığın patogenezinde rol aldığı düşünülmüştür.

Serbest radikallerin rol aldığı tüm kronik karaciğer hastalıklarında olduğu gibi Wilson hastalığı'nda da mitokondri yanında diğer hücre organellerinin fonksiyonlarında da bozulmalar oluşur. Oluşan serbest radikaller, hücre zarının poliansature yağ asitleri, tiol içeren proteinler, karbonhidrat ve nükleik asitle de

reaksiyona girebilir. Lipid peroksidasyon ürünleri fibroblast ve lipositler tarafından kollajen sentezinin artmasına neden olabilir. Bu da Wilson'lu hastalardaki fibrozise katkıda bulunur (22,113).

Bakır toksisitesi oluşturulan hayvanlarda serum ve karaciğer dokusunda artmış MDA düzeylerinin tespiti bakırın oksidan streteki rolünü destekler. Antioksidan vitaminlerin azalmasının ise hasara yatkınlık oluşturduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (113,116).

Hayvan modelleri dışında Wilson'lu ve hemokromatozisli hastalarda yapılan bazı çalışmalar ile hastalıktaki oksidan stresin rolü desteklenmiştir (33). Sokol ve arkadaşları (116) Wilson'lu hastalar ve bakır toksisitesi olan Bedlington Terrier'lerin karaciğer mitokondri ve mikrozomlarını izole ederek lipid peroksidasyon indeksi olarak MDA ve konjuge dienlere baktıklarında, mitokondriyel bakır içeriği ile lipid peroksidasyonunun güçlü korelasyon gösterdiğini görmüşlerdir. Oğihara ve arkadaşlarının (84) Wilson'lu çocuklar üzerinde yaptıkları çalışmada MDA ve vitamin E düzeylerinde kontrol grubuna göre fark saptanmazken, Von Herbay ve arkadaşlarının (130) hemokromatozis, alkolik karaciğer hastalığı ve Wilson'lu hastalarda yaptıkları çalışmada her üç grupta da olmakla beraber en düşük vitamin E/total lipit oranı serum serbest bakırı en yüksek olan Wilson'lu hastalarda bulunmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Gastroenteroloji Bilim Dalı tarafından izlenmekte olan 24 Wilson Hastalığı, 25 hasta kontrol (Wilson dışı-kronik karaciğer hastalığı) ve 23 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 72 çocuk üzerinde yapıldı.

Wilson hastalığı tanısı klinik, laboratuvar yöntemleri ve karaciğer biyopsisi ile konulmuş olup hastaların yaş ortalaması: 11.7 ± 5.11 yıl idi. Bu grup 11 kız (% 45.8), 13 erkek (% 54.2) olgudan oluşuyordu.

Hasta kontrol grubu; 15 kronik B hepatiti, 8 otoimmün ve 2 kriptojenik karaciğer hastalığı olan hastalardan oluşmaktaydı. Bu gruptaki hastaların yaş ortalaması: 11.8 ± 3.53 yıl olup, bu grup 13 kız (% 52), 12 erkek (% 48) olgudan oluşuyordu. Hastalarda tanı viral serolojik göstergelerin çalışılması ve özellikle otoimmün ve kriptojenik olgularda diğer nedenlerin ayrıntılı incelemelerle dışlanması ile konuldu.

Sağlıklı kontrol grubundaki çocukların yaş ortalaması: 10.17 ± 2.97 yıl olup, bu grup 11 kız (% 47.8), 12 erkek (% 52.2) çocuktan oluşuyordu. Çalışmaya alınan olguların yaş ve cinsiyetleri Tablo VII' de görülmektedir.

TabloVII. Çalışmaya alınan olguların yaş ve cinsiyetleri

	Wilson Hastalığı	Hasta Kontrol	Sağlıklı Kontrol
Sayı	24	25	23
Cinsiyet(K/E)	11 / 13	13 / 12	11 / 12
Yaş (yıl)	11.7 ± 5.1	11.8 ± 3.53	10.17 ± 2.97

Hastaların kronik hepatit ya da siroz evresinde olmasının çalıştığımız oksidan stres göstergeler ve antioksidan parametreler açısından bir farklılığa neden olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, Wilson hastaları karaciğer biyopsi bulguları gözetilerek bu açıdan gruplandırıldı. Çalışmada yer alan Wilson hastalarından kronik hepatit olanların sayısı 9 iken, siroz olanların sayısı 15 idi.

Wilson hastalarından tedavi alanların hepsinde D-penisilamin tedavisi uygulanıyordu. Uygulanan şelasyon tedavisinin; çalıştığımız oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametreler üzerine etkisi olabileceğinden, hastalar tedavi özellikleri açısından sınıflandırıldı. Wilson hastalarından 11' i düzenli (ortalama tedavi süresi: 4.59 yıl) , 6' sı düzensiz tedavi almakta idi. Yedi hastaya ise tanı yeni konulmuştu

Hastalardan ilk tanı anında veya düzenli kontrolleri sırasında alınan kan örnekleri yanında aile bilgilendirilerek araştırma için gerekli kan örnekleri de alındı.

Çalışmaya alınan hastaların öykü, fizik muayene bulguları, klinik izlemleri (tedavi düzeni) ile laboratuvar ve karaciğer biyopsi bulguları kaydedildi. Tüm gruptan 12 saatlik açlık sonrası sabah 08:00- 09:00 arasında kan örnekleri alındı. Bu örneklerden vitamin C düzeyleri hemen çalışılırken; β -karoten, vitamin E, Total antioksidan kapasite, MDA ve NO ölçümleri için kan örnekleri -70°C de saklandı.

Vitamin E/Lipit oranının kullanılması vitamin E' nin plazmadaki durumunu göstermede tek başına vitamin E ölçümünden daha uygun bulunduğundan çalışmamızda vitamin E / total kolesterol oranını kullanıldı (66,99,130). Bu amaçla kolesterol düzeyleri çalışıldı

Oksidan stres ve antioksidan durum göstergelerinin etkilenmemesi için, olguların ek hastalığının ve enfeksiyonlarının olmamasına, vitamin almıyor olmalarına dikkat edildi. Kolestatik karaciğer hastalığında yağda eriyen vitamin düzeyleri etkilendiği için bu hastalar çalışmaya dahil edilmedi. β -karoten düzeylerinin etkilenmemesi için serumun ışıktan korunması sağlandı.

Vitamin düzeylerinin ölçümü:

E vitamini Rindi' nin spektrofotometrik yöntemi (96) ile, C vitamini McCormic yöntemi (72) ve β -karoten Neeld-Pearson yöntemine göre (73) spektrofotometrik olarak Pediatrik Metabolizma ve Beslenme Bilim Dalı laboratuvarında çalışıldı.

Total Antioksidan Kapasite :

Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda ve serum örneklerinde TEAC (Troluks eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi kullanılarak çalışıldı. Bu analiz için Randox ticari kiti kullanıldı. Bu metotta ABTS [2,2'-azino-di (3 ethylbenzthiazoline sulphonate)] peroksidaz ve hidrojen peroksit ile inkübe edilerek "ABTS radikal katyonu" oluşturmaktadır. Bu sırada oluşan mavi-yeşil renk eklenen numunedeki antioksidanların konsantrasyonları ile orantılı olarak azalma göstermekte ve rengin şiddetindeki azalma spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (74).

TEAC yöntemi ile vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoidler, ürik asit, billüribin, albümin, transferrin, seruloplazmin, selenyum, SOD, GSH, GSH-Px ve katalazın antioksidan kapasiteye etkileri değerlendirilebilmektedir (74).

MDA Ölçümü:

Plazmada MDA düzeyi TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif substans) yöntemi kullanılarak Biyokimya Araştırma Laboratuvarı' nda ölçüldü. Bu metotun esası; MDA 'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek renkli bileşik oluşturması ve oluşan bu kompleksin absorbansının 532 nanometrede spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır (124).

NO ölçümü:

NO düzeyleri, Miranda ve arkadaşlarının tanımladığı modifiye Griess yöntemi ile Fizyoloji Laboratuvarında çalışıldı. Bu yöntemin esası; asidik griess reaktifi tarafından saptanması sonucunda nitrat seviyesinin azalmasına dayanır. Bu yöntemle nitrat ve nitrit birlikte ölçülür (75) .

İstatistiksel analiz:

Çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki üç grup arasındaki fark "Kruskal-Wallis testi" ile; iki grup arasındaki fark grupların dağılımı normal dağılıma uyduğu için "student's t testi" ile değerlendirildi.

Değerlendirmeler "Statistical Package for Social Sciences (SPSS/PC 10.0) for Windows" bilgisayar ortamında yapıldı. Tablolarda sonuçlar "Ortalama $\pm$ standart sapma (SS)" olarak verildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma; 24 Wilson Hastalığı, 25 hasta kontrol (Wilson dışı kronik karaciğer hastalığı) ve 23 sağlıklı kontrol grubundan oluşan üç grupta yapıldı.

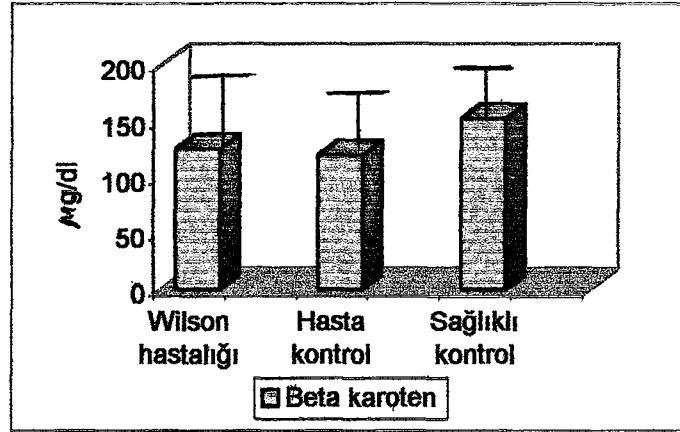
Wilson hastaları'nın yaş ortalaması 11.7 ± 5.11 yıl idi. Bu grup 11 kız (% 45.8), 13 erkek (% 54.2) olgudan oluşmaktaydı. Hasta kontrol grubu; 15 kronik B hepatiti, 8 otoimmün ve 2 kriptojenik karaciğer hastalığı olan hastaları içermektedir. Bu grubun yaş ortalaması 11.8 ± 3.53 yıl olup, hastaların 13' ü kız (% 52), 12' si erkek (% 48) idi. Sağlıklı kontrol grubundaki çocukların yaş ortalaması ise 10.17 ± 2.97 yıl olup, bu grup 11 kız (% 47.8), 12 erkek (% 52.2) olgudan oluşmaktaydı. Üç grup arasında yaş ve cinsiyet dağılımları açısından farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$)

Wilson hastalığı, hasta kontrol ve sağlıklı kontrol grubunda oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametrelerin sonuçları Tablo VIII'de görülmektedir.

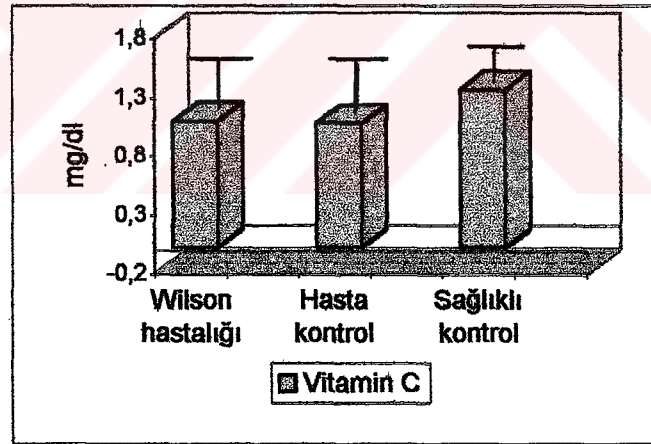
Tablo VIII. Wilson hastalığı, hasta kontrol (wilson dışı kronik karaciğer hastalığı) ve sağlıklı kontrol gruplarında ölçülen oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametrelerin karşılaştırması

	Wilson Hastalığı (n=24)	Hasta Kontrol (n=25)	Sağlıklı Kontrol (n=23)	p
β -Karoten ($\mu\text{g/dl}$)	125.32 ± 62.49	119.69 ± 53.11	$152.49 \pm 9.54^*$	0.049
Vitamin C (mg/dl)	1.07 ± 0.51	1.05 ± 0.53	$1.34 \pm 0.48^*$	0.046
VitaminE/kolesterol (mg/L/ mg/L)	0.09 ± 0.0024	0.11 ± 0.0049	0.107 ± 0.003	0.611
Total Antioksidan Kapasite(mmol/L)	1.52 ± 0.69	1.15 ± 0.44	$1.93 \pm 0.49^*$	0.0001
MDA (nmol/ml)	4.63 ± 3.59	3.37 ± 1.68	$2.37 \pm 1.71^*$	0.013
NO ($\mu\text{mol/L}$)	27.18 ± 20.27	16.39 ± 12.83	$10.32 \pm 4.40^*$	0.001

Willson hastalığı ve hasta kontrol grubunda ölçülen vitamin C ve β -karoten düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber; Wilson hastalığı'nda sadece C vitamini, hasta kontrol grubunda ise sadece β -karoten düzeyindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (şekil 3,4).



Şekil 3. Wilson hastalığı, hasta kontrol ve sağlıklı kontrol grubundaki β -karoten düzeyleri

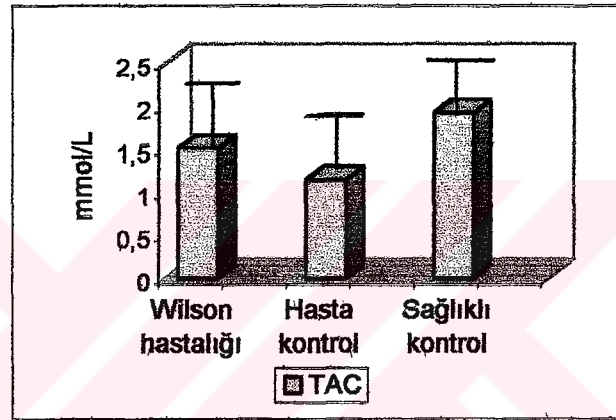


Şekil 4. Wilson hastalığı, hasta kontrol ve sağlıklı kontrol grubundaki vitamin C düzeyleri

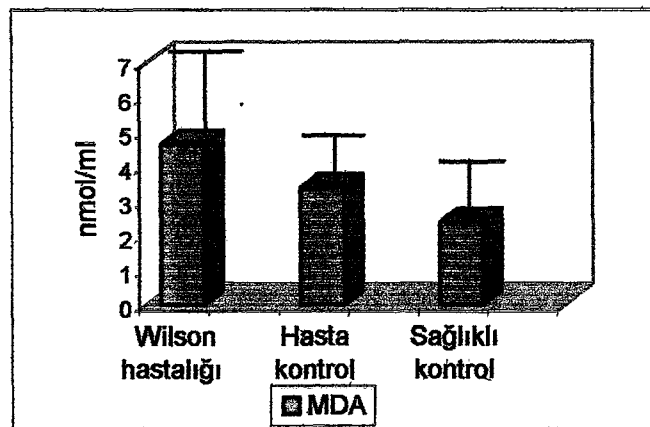
Wilson hastalığı, hasta kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grupları arasında vitamin E/Kolesterol değerleri arasında fark saptanmadı ($p>0.05$).

Total antioksidan kapasite, Wilson hastalığı ve hasta kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). Wilson hastalığı ve hasta kontrol grupları arasında bu parametre açısından fark yoktu (şekil 5) ($p>0.05$).

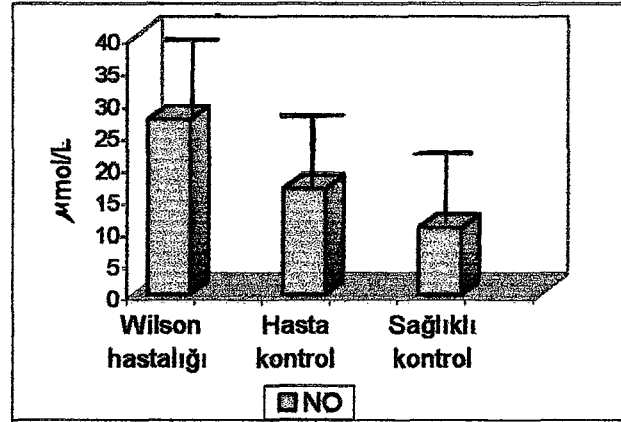
MDA ve NO düzeyleri, Wilson hastalığı ve hasta kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksekti ($p<0.05$). Wilson hastalığı ve hasta kontrol grupları birbiri ile karşılaştırıldığında Wilson hastalarında bu değerler daha yüksek olmakla beraber fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (şekil 6,7)



Şekil 5. Wilson hastalığı, hasta kontrol ve sağlıklı kontrol grubundaki total antioksidan kapasite düzeyleri



Şekil 6. Wilson hastalığı, hasta kontrol ve sağlıklı kontrol grubundaki MDA düzeyleri



Şekil 7. Wilson hastalığı, hasta kontrol ve sağlıklı kontrol grubundaki NO düzeyleri

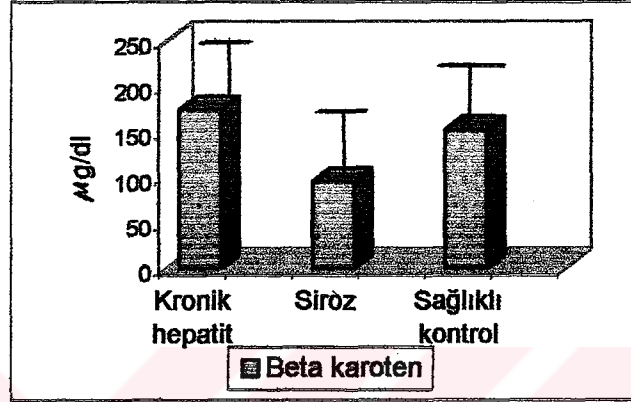
Hastaların siroz ya da kronik hepatit evresinde olmasının çalıştığımız oksidan stres ve antioksidan durum göstergelerini etkileyebileceği düşüncesi ile, karaciğer biyopsi bulguları temel alınarak, Wilson hastaları kronik hepatit ve siroz olarak gruplandırıldı. Çalışmada yer alan Wilson hastaları'ndan kronik hepatit olanların sayısı 9 iken, siroz olanların sayısı 15 idi.

Wilson hastalığı grubunu siroz ve kronik hepatit olarak ayırıp oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametreler açısından tablo IX' da görülmektedir.

Tablo IX. Wilson hastalarında siroz ve kronik hepatit olgularının ölçülen oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametreler açısından karşılaştırılması

	Hepatit (n=9)	Siroz (n=15)	Sağlıklı Kontrol (n=23)	P
β-Karoten (µg/dl)	174.93 ± 56.78	95.56 ± 45.18*	152.49±49.54	0.001
Vitamin C (mg/dl)	1.25 ± 0.56	0.96 ± 0.45*	1.34 ± 0.48	0.014
Vitamin /kolesterol (mg/L/ mg/L)	0.0089±0.0022	0.0097±0.0025	0.107 ± 0.003	0.356
Total Antioksidan Kapasite(mmol/L)	1.31 ± 0.57*	1.65 ± 0.74	1.93 ± 0.49	0.013
MDA (nmol/ml)	4.38 ± 3.80	4.77 ± 3.58	2.37 ± 1.71*	0.024
NO (µmol/L)	23.57 ± 14.66	29.34 ± 23.21	10.32 ± 4.40*	0.003

β -karoten düzeyleri açısından kronik hepatit evresindeki hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı (şekil 8) ($P>0.05$). Siroz evresindeki hastalarda β -karoten düzeyleri, sağlıklı kontrol grubu ve kronik hepatitli hastalara göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$) (şekil 8).



Şekil 8. Wilson hastaları' nda kronik hepatit ve sirozlu olgular ile sağlıklı kontrol grubunun β -karoten düzeyleri

Vitamin C düzeyleri açısından kronik hepatitli Wilson hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). Siroz evresindeki Wilson hastaları'nda Vitamin C düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$). Kronik hepatit ve sirozlu hasta grupları arasında vitamin C düzeyleri açısından bir fark bulunmadı ($P>0.05$).

Kronik hepatit evresindeki Wilson hastaları, siroz evresindeki Wilson hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında vitamin E/kolesterol değerleri arasında fark saptanmadı ($P>0.05$).

Wilson hastalığında, total antioksidan kapasite düzeyleri siroz ve kronik hepatit evrelerinde sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulundu. Ancak sadece hepatit evresindeki hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel

olarak anlam taşımaktaydı ($p<0.05$). Total antioksidan kapasite düzeyleri açısından siroz ve kronik hepatit evreleri arasında fark bulunmadı ($P>0.05$).

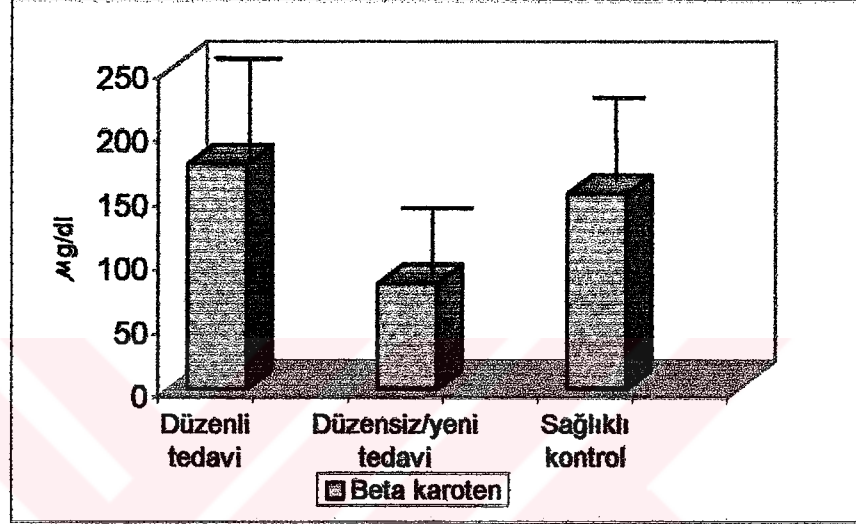
MDA ve NO düzeyleri kronik hepatit ve siroz evresindeki Wilson hastaları'nda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksekti ($p<0.05$). Kronik hepatit evresindeki Wilson hastaları ile siroz evresindeki Wilson hastaları arasında MDA ve NO düzeyleri arasında fark bulunmadı ($P>0.05$, $P>0.05$).

Wilson hastaları, tedavinin oksidan stres ve antioksidan durum üzerine etkisinin araştırılması amacıyla, hastalığın evresi dikkate alınmadan henüz tedavi başlanmamış hastalar bir grubu ile düzensiz tedavi alan hastalar ve düzenli tedavi alan hastalar diğer grubu oluşturacak şekilde gruplandırıldı. Bu gruplar kendi aralarında ve sağlıklı kişilerle karşılaştırıldı. Elde edilen oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin verilerin sonuçları tablo X' de görülmektedir.

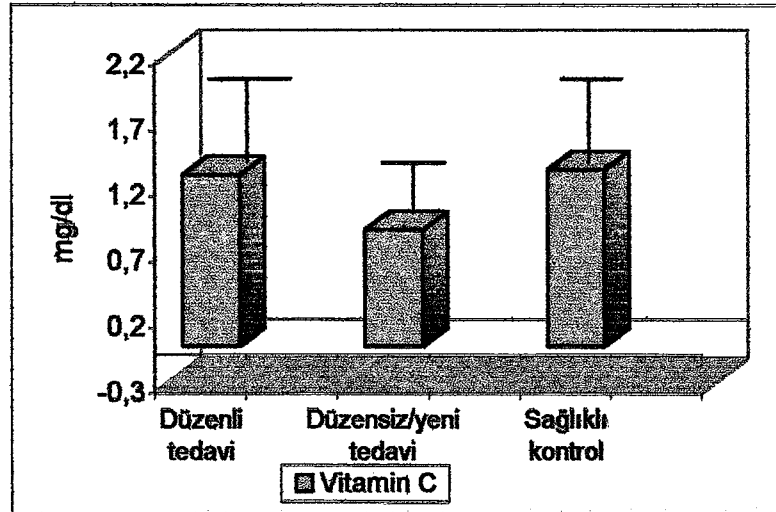
Tablo X. Wilson hastalığı grubunun tedavi düzenlerine göre ölçülen oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametreler açısından karşılaştırılması

	Düzenli Ted. (n=11)	DüzensizTed+ Yeni tanı (n=13)	Sağlıklı Kontrol (n=23)	P
β -Karoten ($\mu\text{g/dl}$)	176.05 $\pm$ 44.95	82.40 $\pm$ 38.01*	152.49 $\pm$ 49.54	0.001
Vitamin C (mg/dl)	1.30 $\pm$ 0.59	0.88 $\pm$ 0.34*	1.34 $\pm$ 0.48	0.001
VitaminE/kolesterol (mg/L/ mg/L)	0.095 $\pm$ 0.0019	0.0093 $\pm$ 0.0027	0.107 $\pm$ 0.003	0.564
Total Antioksidan Kapasite(mmol/L)	1.52 $\pm$ 0.56	1.53 $\pm$ 0.81	1.93 $\pm$ 0.49*	0.036
MDA (nmol/ml)	3.73 $\pm$ 2.01	5.38 $\pm$ 4.46*	2.37 $\pm$ 1.71	0.014
NO ($\mu\text{mol/L}$)	21.94 $\pm$ 13.99	31.61 $\pm$ 24.03	10.32 $\pm$ 4.40*	0.017

Düzenli tedavi alan hastaların β -karoten ve vitamin C düzeyleri ile sağlıklı kontrol grubu arasında fark saptanmadı ($P>0.05$) (şekil 9,10). Yeni tanı alan ve düzensiz tedavi alan hastalardan oluşan grupta, β -karoten ve vitamin C düzeyleri sağlıklı kontrol grubu ve düzenli tedavi alan gruba göre anlamlı düşük bulundu ($P<0.05$) (şekil 9,10).



Şekil 9. Wilson hastalığı'nda düzenli tedavi alan hastalar, düzensiz tedavi alan ya da yeni tanı konulmuş hastalar ve sağlıklı kontrol grubunun β -karoten düzeyleri

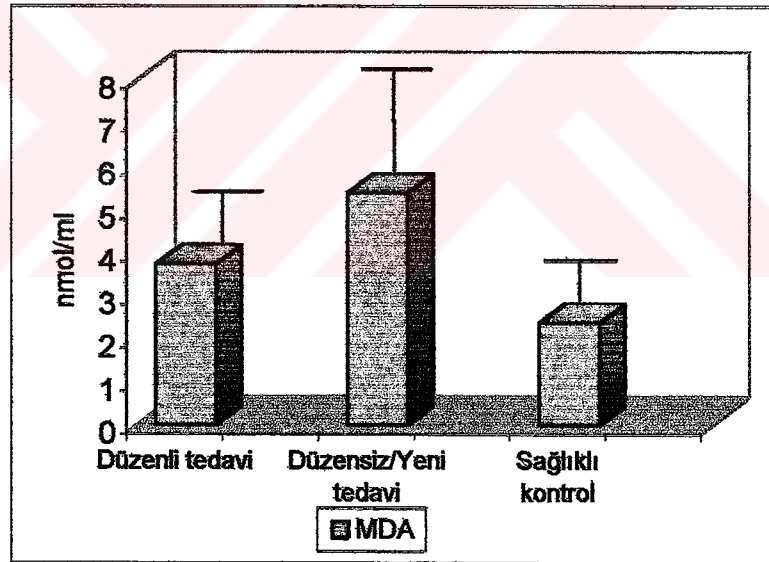


Şekil 10. Wilson hastalığı'nda düzenli tedavi alan hastalar, düzensiz tedavi alan ya da yeni tanı konulmuş hastalar ve sağlıklı kontrol grubunun vitamin C düzeyleri

Total antioksidan kapasite düzeyleri sağlıklı kontrol grubunda her iki hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).

Total antioksidan kapasite düzeyleri açısından yeni tanı alan ve düzensiz tedavi alan hastalardan oluşan grup ile düzenli tedavi alan grup arasında fark saptanmadı ($P>0.05$).

Gruplar arasında en yüksek MDA değerleri, yeni tanı alan ve düzensiz tedavi alan hastalardan oluşan grupta saptandı. Bu grupta MDA düzeyleri düzenli tedavi alan hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p<0.05$) (şekil 11).MDA değerleri açısından sağlıklı kontrol grubu ve düzenli tedavi alan hastalar arasında fark yoktu ($P>0.05$) (şekil 11).



Şekil 11. Wilson hastalığı'nda düzenli tedavi alan hastalar, düzensiz tedavi alan ya da yeni tanı konulmuş hastalar ve sağlıklı kontrol grubunun MDA düzeyleri

Yeni tanı alan ve düzensiz tedavi alan grup ile düzenli tedavi alan hastalarda NO düzeyleri açısından anlamlı farklılık yoktu ancak her iki grupta da sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Oksidan stres olarak tanımlanan, serbest radikal üretiminin arttığı ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin gücünün azaldığı durum, son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan birisidir. Oksidan stresin çocukluk çağında pek çok hastalıktaki rolü geniş araştırmalara konu olmuştur (132). Çeşitli kronik karaciğer hastalıklarında da serbest radikallerin rolü olduğu bilinmektedir (11,14,22,25, 34,63,92,98,129,135)

Wilson hastalığı yanında otoimmün, kronik hepatit B ve kriptojenik karaciğer hastalığı olgularını da içeren çalışmamızda oksidan stresi değerlendirmek için lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA ve bir serbest radikal olan NO çalışıldı. Ayrıca serumun total antioksidan kapasitesi ve antioksidan özelliği olan β -karoten, vitamin E ve vitamin C düzeyleri ölçüldü. Böylece oksidan strese verilen antioksidan cevabı görmek ve antioksidan vitaminlerin yardımcı bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek amaçlandı.

MDA ölçümünde kullandığımız TBARS yöntemi, hem plazma hem de dokularda oksidan stresi göstermek amacıyla en sık kullanılan yöntemdir (36,101,116,127). Son yıllarda reaktif oksijen radikalleri yanında, başta NO olmak üzere reaktif nitrojen radikallerinin de patolojik olaylarda artarak lipid, protein ve DNA hasarında etkili olduğu ortaya konmuştur. Sitotoksik özelliği olan NO' nun inflamatuvar uyaranlara karşı karaciğer yanıtının oluşmasında aracı olduğu düşünülmektedir (4,39,59,102,132). NO ölçümünde kullandığımız Modifiye Griess yöntemi, nitrat ve nitriti aynı anda ölçmeye uygun basit, ucuz ve duyarlı bir metottur (75).

Antioksidan vitaminlerin düzeyi, oksidan strese yanıtı göstermesi nedeniyle araştırmalarda tek başına ya da MDA gibi oksidan stres göstergeleri ile beraber ölçülmüştür (34,84,116,138,143). Bu çalışmalarda özellikle vitamin E ve C önemli antioksidanlar olarak görülmektedir (18). Vitamin E lipoproteinlerle taşındığı için hiperlipidemi durumunda, normal vitamin E düzeylerine rağmen E vitamini yetersizliğinin klinik ve histopatolojik bulguları ortaya çıkabilir. Bu nedenle vitamin E/Lipit oranının kullanılması vitamin E' nin plazmadaki durumunu göstermede tek başına vitamin E ölçümünden daha uygun bulunmuştur (130). Bazı araştırmalarda vitamin E/ total lipid oranı (98,112,130), bazılarında ise vitamin E / total kolesterol oranı kullanılmıştır (66,99). Çalışmamızda vitamin E düzeylerini yorumlarken vitamin E / total kolesterol oranı kullanıldı. A vitamini çalışmalarda retinol, β - karoten ya da diğer karotenoidler (licopen gibi) şeklinde yer almıştır (11,35,86,98,109,129,142). Araştırmamızda retinol öncüsü olan β - karoten düzeyleri çalışıldı.

Antioksidan savunma elemanlarının tek tek etkileri dışında birbirleriyle de karmaşık ilişkiler içinde oldukları görülmüştür (92). Bu ilişkiler, sinerjistik etkileşimleri de içerir. Örneğin; vitamin C ve glutatyon, vitamin E' nin rejenerasyonunu sağlayarak (11,57,70,82,84,129,142); ürik asit, vitamin C' nin otooksidasyonunu engelleyerek (11,26) sinerjistik etki gösterirler. Bu nedenle antioksidan durumu göstermek için tek tek antioksidanların ölçümü yanında değişik antioksidanların etkilerinin toplamını gösteren 'total antioksidan kapasite' ölçümü kullanılabilir (84,92,142). Çeşitli total antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri vardır (3,42,54,60,64,83,93,95). Bu çalışmada total antioksidan kapasite ölçümünde kullanılan TEAC yöntemi ile vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoidler, ürik asit, bilirubin, albümin, transferrin, seruloplazmin, selenyum, SOD, GSH, GSH-Px ve

katalaz değeriendirilebilmektedir. Randox kitinin kullanıldığı bu metot bazı çalışmalarda referans metot olarak gösterilmiştir (3,27,60).

Literatürde çeşitli karaciğer hastalıklarında oksidan stresin rolünü araştıran çok sayıda araştırma vardır (11,14,22,25,34,63,92,98,129,135). Bu çalışmaların çoğunda MDA ve çeşitli antioksidanlar birlikte çalışılmıştır. Ayrıca kronik karaciğer hastalıklarında NO' nun rolü ve siroz komplikasyonlarının oluşumuna katkısı sıkça yer almıştır (7,18,26,29,46,71,85,125,128). Ancak bu konularda özellikle çocukluk çağında yapılmış ve Wilson hastalığı'nı içeren çalışma sayısı azdır (53,84,88,102). Sokol ve arkadaşları (113), karaciğer hastalıklarında etyolojiye bakılmaksızın mitokondriyel lipid peroksidasyonunun değişik derecelerde gerçekleştiğini ancak bakır toksisitesinde öneminin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Bu düşünceden yola çıkılarak biz de Wilson hastalığı'nda biriken bakırın ek bir oksidan stres oluşturup oluşturmadığını belirlemek istedik. Bu nedenle esas çalışma grubumuzu Wilson hastaları oluşturdu ve diğer kronik karaciğer hastalıklarından oluşan bir grup da hasta kontrol grubu olarak dahil edildi. Oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin göstergeler sağlıklı grup yanında bu iki grup arasında da karşılaştırıldı. Sonuçta; hem Wilson hastalığı hem de Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarında sağlıklı kontrol grubuna göre NO ve MDA değerlerini yüksek iken, total antioksidan kapasite düşük bulundu. Her iki hastalık grubunda da vitamin C ve ̢-karoten düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre düşüktü. Ancak Wilson hastaları'nda sadece C vitamini düşüklüğü, Wilson dışı kronik karaciğer hastalarında ise sadece ̢-karoten düşüklüğü istatistiksel olarak anlam taşıymaktaydı. Wilson ve Wilson dışı kronik karaciğer hastalıkları arasında, çalışılan oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametreler arasında anlamlı fark görülmedi.

Elde edilen veriler sonucunda Wilson hastalığı'nda ve Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarında oksidan stresin varlığı gösterildi. Wilson hastalığı'nda oksidan stres ve antioksidan göstergelerinin diğer kronik karaciğer hastalıklarından ayrı bir özellik göstermediği gözlemlendi. Literatürdeki çalışmaların çoğu çeşitli karaciğer hastalıklarının patogenezinde serbest radikallerin rolünü ve bulgularımızı destekler özelliktedir:

Kronik viral hepatitlerde aşırı olmayan ancak sürekli olan oksidan stresin hücre DNA' sını etkileyerek mutasyonlara neden olduğu; ayrıca fibroblastik aktiviteyi arttırarak bir süre sonra siroz, kanser gibi komplikasyonların oluşmasına neden olduğu bilinmektedir (14,34,86). Çalışmamızda; Wilson dışındaki kronik karaciğer hastalarının çoğu kronik viral B hepatiti olan hastalardan oluşmaktaydı. Yapılan çalışmalarla akut ve kronik B hepatitli olgularda MDA' nın yükseldiği, antioksidan kapasitenin ise azaldığı gösterilmiştir (34,56,141). Bianchi ve arkadaşlarının (14) viral hepatitleri de içeren 45 sirozlu hastada yaptıkları çalışmada sağlıklı gruba göre MDA seviyelerinin ortalama iki kat arttığı görülmüştür.

Literatürde viral hepatitler dışındaki diğer kronik karaciğer hastalıklarında da oksidan stresin rolü araştırılmıştır. Hemokromatozis karaciğerde Fe birikimi ile karakterli bir hastalıktır. Etyopatogeneze yönelik araştırmalarda sıklıkla Wilson hastalığı ve hemokromatozis arasında ilişki kurulur. Hemokromatoziste, alkolik karaciğer hastalığında ve değişik nedenlere bağlı sirozlarda serumda MDA' nın arttığı gösterilmiştir (14,106,143).

Kronik karaciğer hastalıklarında NO' nun siroz komplikasyonlarının meydana gelmesindeki rolü sıkça çalışılmasına rağmen siroz öncesi bir durum olan kronik hepatit ve siroz- hepatit evreleri arasında NO' nun etkilerini karşılaştıran

çalışma sayısı azdır (58,85,125). Çalışmaların çoğunda NO' nun son ürünleri olan nitrat ve nitrit, bazılarında ise NOS aktivitesi ölçülmüştür.

Kronik viral hepatitlerde NOS aktivitesinin arttığı ve hastalığın aktivitesiyle orantılı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kronik viral hepatitlerin patogeneğinde NO 'nun çok önemli rolü olduğu düşünülmektedir (58). Bu konudaki yayınların çoğu hepatit C virüsü ile ilgilidir (79). Çalışmamızdaki viral hepatitler ise B hepatiti kaynaklıdır. Hepatit virüsleri ile oluşan kronik hepatitlerde, virüslerin hücrenin prooksidan-oksidan dengesini, hücresel prooksidanları (Fe,NO gibi) arttırarak değiştirdiği ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini engellediği düşünülmüştür (56).

Ülkemizde yapılan çalışmalardan Umur ve arkadaşları (125), Özcan ve arkadaşları (85) kronik hepatit ve sirozlu hastalarda kontrol grubuna göre NO ve nitrat düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Coşkun ve arkadaşlarının (29) çalışmasında ise asit, spontan bakteriyel peritonit, anemi gibi komplikasyonlara bakılmaksızın tüm sirozlarda nitrat ve nitrit düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Otoimmün hepatitlerde karaciğer dokusunda NOS aktivitesinin arttığı ve hastalığın histolojik bulgularının şiddeti ile orantılı olduğunu, dolayısıyla NO' nun karaciğer hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (100). Bizim çalışmamızda da 8 hasta otoimmün hepatit tanılı idi.

Kronik karaciğer hastalıklarında vitamin düzeylerini inceleyen çalışmalara bakıldığında kriptojenik nedenleri de içeren çeşitli siroz gruplarında β -karoten düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (34,81,86,98). Palabıyıköğlu ve arkadaşları (86) kontrol grubuna göre hem retinol hem de β -karoten düzeylerini düşük bulmuşlardır. Dikici ve arkadaşlarının (34) çalışmasında

akut hepatitlerde daha belirgin olmak üzere β -karoten düzeyleri düşük saptanmıştır. Newsome ve arkadaşları (81) ise kronik hepatitten siroza ve hepatosellüler karsinoma gidildikçe β -karoten düzeylerinin ilerleyici bir şekilde düştüğünü göstermişlerdir. Hemokromatoziste her üç antioksidan vitaminin azaldığı (143), alkolik karaciğer hastalığında serum ve karaciğer dokusunda β -karoten seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir (63). Çalışmamızda da hem Wilson hastalığı'nda hem de çoğunluğu viral nedenlerle oluşan Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarında serum β -karoten düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre düşük tespit edildi.

Dubey ve arkadaşlarının (37) çalışmasında virüslere ve alkole bağlı hepatitlerde, çeşitli siroz gruplarında ve hepatosellüler karsinomda plazma vitamin C düzeyleri düşük bulunmuştur. Yamamoto ve arkadaşları (137) da bunu destekleyen veriler elde etmişlerdir. Beattie ve arkadaşları (12) alkolik karaciğer hastalığı ve primer bilier sirozlu hastalarda lökosit askorbik asit düzeylerinin düşük olduğunu göstermişlerdir.

Hastalığın kronik hepatit yada siroz evresinde olmasının oksidan stres ve antioksidan duruma ilişkin parametreleri ne yönde etkilediğini belirlemek amacı ile çalışmamızda Wilson hastalığı olguları kronik hepatit ve siroz olarak gruplandırarak tekrar değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda MDA ve NO açısından hastalığın hepatit ya da siroz evresinde olmasının önem taşımadığını, her iki evrede de yükseldiğini saptadık. Total antioksidan kapasite her iki evrede de düşmekle beraber hepatit evresinde daha düşük bulundu.

Literatürde Wilson hastalığı'nda oksidan stresin rolü ile ilgili yayınların büyük bölümü yetişkinlerde ve deneysel hayvan modellerindedir. Az sayıdaki bu

Çalışmaların çoğunda hastalığın patogenezinde serbest radikallerin rolü olduğu gösterilmiş ve bizim araştırmamızdakine benzer bulgular elde edilmiştir:

Sokol ve arkadaşları (116) Wilson'lu hastalar ve bakır toksisitesi olan Bedlington Terrier'lerin karaciğer mitokondri ve mikrozomları izole ederek lipid peroksidasyon göstergesi olarak MDA ve konjuge dienerlere baktıklarında, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bakır toksisitesinde hedef organel mitokondridir ve bakır fazlalığı mitokondriyel fonksiyonları değiştirir. MDA ise mitokondride metabolize olur. Bu nedenle Wilson'lu hastalarda MDA seviyelerinin yükselmesi lipid peroksidasyonu sonucu olduğu kadar MDA metabolizmasının azalmasına da bağlı olabilir. Aynı araştırmacının Wilson'lu hastaların hayvan modellerini oluşturan sıçanlarda yaptığı başka çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiş; bakırdan yüksek diyetle beslenen sıçanların mitokondrisindeki azalmış sitokrom c oksidaz aktivitesi ile serum ve karaciğer dokusunda artmış MDA düzeyleri gösterilmiştir (111,113,138). Fern ve arkadaşları (41) bakırın in vitro olarak LDL oksidasyonunun nedeni olduğunu, Nair ve arkadaşları (80) lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkan MDA gibi aldehitlerin Wilson hastalığı'ndaki karaciğer hasarının patogenezinde rol alabileceğini savunmuşlardır.

Ogihara ve arkadaşlarının (84) Wilson'lu 9 ocuk üzerinde yaptıkları çalışmada, MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre fark saptanmamıştır. Çalışmamızda MDA düzeyleri Ogihara ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak yüksekti. Ogihara'nın çalışmasında MDA düzeylerinin normal olması Wilsonlu hastalarda oluşan oksidan hasara lipid peroksidasyonunun katkısının az olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Ancak alışmacılar bu konudaki diğer çalışmaları

örnek göstererek böyle bir sonuca varamayacaklarını belirtmektedirler (84). Tartışılan bu çalışmada hasta sayısının az olması nedeni ile sonuçların etkilenmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Rodo ve arkadaşları (99) Wilson'lu 45 yetişkin hastada yaptıkları çalışmada in vitro olarak LDL oksidasyonları arasında fark gözlememiştir. Ancak hasta sayısı olarak daha kapsamlı olan bu çalışmada da, plazmadaki vitamin E/total kolesterol oranı düşük bulunmuştur. Bu bulgu lipid peroksidasyonunun hastalığın patogenezinde rol alabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Wilson hastalarında kronik hepatit ve siroz evresine bağlı olmaksızın NO'yu yüksek saptadık. Literatürde Wilson hastalığı'nda NO'nun rolü ile ilgili yapılmış çok az çalışma vardır. Ancak NO ve peroksinitritin aşırı üretiminin solunum zincirinde hasara yol açtığı ve bu hastalıklardan birisinin de Wilson hastalığı olduğu belirtilmektedir (102,104).

Karaciğer hücreleri NOS sentezler ve TNF- α , IL-1ve IL-6 uyarısıyla NO yaparlar. Bu nedenle kronik inflamasyon sırasında NO oluşumu artar (51,58,125). Yapılan çalışmalarda serumdaki IL-6 ve TNF- α düzeyi ile NO düzeyinin orantılı olduğu gösterilmiştir (58). Vücutta normalde de yapılan NO üretiminin, dokudaki sitotoksik oksijen radikalleri varlığında inflamasyona yanıt olarak daha fazla arttığı belirtilmektedir (44,50). Özellikle NO üretimi sırasında ortaya çıkan peroksinitrit hücre üzerine çok toksiktir. (105,107)

NO aracılı hücre hasarı çeşitli mekanizmalarla olur. Bunlar mitokondriyal solunum ve enzim inhibisyonu, lipid peroksidasyonu ve genetik mutasyonları içerir (44). NO'nun akut hepatit enfeksiyonunda antimikrobiyal ve apoptozisi engelleyici olduğu, ancak kronik karaciğer hastalıklarında sitotoksik, genotoksik olduğu ve hatta kanser gelişimine yol açabileceği gösterilmiştir (44,51). Reaktif oksijen radikallerinin

ve NO' nun p53 gen mutasyonu ile Wilson hastalarında kanser gelişimine yol açabileceği konusunda yayınlar vardır (53,102,104) Yüksek NO seviyeleri son dönem karaciğer hastalığının bazı komplikasyonlarının ortaya çıkmasına da neden olur (7,97).

Wilson hastalığı'nda total antioksidan kapasiteyi hepatit ve siroz evresinde sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulduk. Hepatit evresindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Total antioksidan kapasitenin hepatit evresinde daha düşük olması ve hastalığın evresi ilerledikçe kısmen yükselmesi; siroz evresinde bizim bu çalışmada kullandığımız yöntemle ölçemediğimiz başka antioksidanların devreye girmesi ile açıklanabilir.

Wayner ve arkadaşlarının tarif ettiği TRAP yönteminden sonra çok sayıda total antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Çoğu yöntem serbest radikallerin çeşitli prooksidanlar kullanılarak engellenmesine dayanır. Bu yöntemlerin herbirinde değişik antioksidanların total antioksidan kapasiteye katkısı belirlenir. Örneğin; Koraçević ve arkadaşlarının tanımladığı TAC yönteminde genellikle düşük molekül ağırlıklı ve zincir kıran antioksidanlar değerlendirilirken, antioksidan enzimler ve metal bağlayıcı proteinler bunun dışında kalır (60,143). Ayrıca in vitro şartlarda ölçülen total antioksidan kapasitenin dinamik bir yapı olan canlıda farklı oksidanların üretilmesi nedeniyle değişik sonuçlar vereceği düşünülmüştür (93,143). Ölçülen antioksidanları etkileyen çeşitli metabolik durumlarda total antioksidan kapasite etkilenebilir. Örneğin; böbrek yetmezliğinde ürik asit yükselir ve total antioksidan kapasite yüksek olarak değerlendirilebilir. Benzer şekilde diyet nedeniyle protein içeriği düşük olan plazmada total antioksidan kapasite düşük bulunabilir (60, 93,143) Bu özellikler nedeni ile total antioksidan

kapasitenin oksidan stresi göstermede tek başına yeterli olamayacağını, mutlaka diğer antioksidanlar ya da oksidan stresi gösteren MDA gibi ölçümlerle birlikte kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Wilson hastalığı olgularında çalışılan vitaminler içinde β -karoten ve vitamin C düşüklüğü belirgin olarak siroz evresindeki olgularda saptandı. Wilson hastalığı ile ilgili araştırmalarda vitamin C' nin vitamin E ile birlikte diğer plazma antioksidanlarına göre daha etkili antioksidan olduğu belirtilmektedir (84). Vitamin C sıvıda eriyen güçlü indirgeyici özelliği olan bir antioksidandır (109). Lipid peroksidasyonunun ancak vitamin C tamamen tükendiğinde meydana geleceğini savunan yayınlar vardır (94). Askorbik asitten yoksun ancak diğer plazma antioksidanlarından zengin plazma, oksidan strese daha duyarlıdır (94). Yüksek doz C vitamini ile beslenen guinea domuzları ve insanlarda plazma bakırının azalması yoluyla bakır aracılı oksidan stresin azaldığı gösterilmiştir (129). Wilson'lu çocuklarda total antioksidan kapasiteye en çok vitamin C ve ürik asitin katkıda bulunduğu bildirilmiştir (84).

Çalışmamızda siroz evresindeki Wilson hastalarında β -karoten düzeylerini hepatit evresindeki hastalara göre daha düşük bulundu. A vitamini hem eksikliğinde hem de fazlalığında karaciğer hasarına yol açması nedeniyle geniş araştırma konusu olmuştur (7,43). A vitamininin (retinol) kronik karaciğer hastalıkları ve sirozda azaldığına dair yayınlar sıklıkla (11,81,86,98,129). Bu yayınların bir kısmında kronik hepatitten siroza ve hepatosellüler karsinoma gidildikçe serum retinol düzeylerinin azaldığı, bu nedenle bu vitaminin eksiliğinin kanser gelişiminde risk olduğu belirtilmiştir (81). Sirozlu olgulardaki A hipovitaminozu ile ilgili olarak safraya azalmış safra tuzu salınımı, portal hipertansiyon, bozulmuş lenfatik drenaj, plazma

protein ve lipoproteinlerinde bozukluklar, azalmış depolanma ve RBP (retinol bağlayıcı protein) gibi kısa ömürlü protein yıkımında oluşabilecek değişiklikler suçlanmaktadır.(34,63).

A vitaminin ön maddesi olan β -karoten ile siroz ilişkisini ele alan yayınlar retinole göre oldukça azdır (98). Literatürde karotenoidlerin antikanser etkileri, antioksidan etkilerinden çok daha fazla çalışılmıştır. Ancak karotenoidlerin serbest radikal aracılı oksidan hasarda önleyici oldukları ve karaciğerde oksidan hasarı engelledikleri belirtilmektedir (63,98). β -karotenin lipid peroksidasyonunun geç fazında rol aldığı görülmüştür (11). Çalışmalarda çeşitli nedenlere bağlı siroz olgularında serum β -karoten konsantrasyonlarının azaldığı ve β -karoten ile diğer karotenoidlerden fakir diyetle ilgili olarak karaciğerde oluşan yapısal değişiklikler gösterilmiştir (11,98). Çalışmamızdaki sirozlu olgularda saptadığımız β -karoten düşüklüğü bu mekanizmalara bağlı olarak oluşmuş olabilir. Antioksidan özellikteki β -karotenin azalması da sonuçta oksidan stresin artmasına yol açar.

Deneysel çalışmalarda sıçanlar vitamin E , retinol ve β -karoten destekli diyet alacak şekilde üç gruba ayrılarak plazma C vitamini düzeyi bakıldığında, en çok β - karoten destekli grupta C vitaminin yükseldiği görülmüştür. Bu bulgu iki vitamin arasındaki sinerjistik etkiye örnektir. Truscoh ve Bölm' ün çalışmalarında (129) da β - karotenin vitamin C ile ilişkisi gösterilmiştir. Buna göre C vitamini karotenoid radikalini ortadan kaldırarak sinerjistik etki gösterir. Sonuçta β -karotenin antioksidan etkisi dolaşımdaki vitamin C' den etkilenebilmektedir. Çalışmamızda da bu iki vitaminin birlikte azalması aralarındaki sinejizma ile açıklanabilir.

Çalışmamızda Wilson hastalığı'nın siroz ya da hepatit evresine göre değişmeksizin vitamin E/kolesterol oranlarında kontrol grubuna göre fark

saptamadık. Vitamin E/kolesterol oranı, Wilson dışındaki kronik karaciğer hastalıklarında da sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı değildi. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Wilson'lu hastalar ve bakır toksikozlu Bedlington Terrierler'de karaciğer dokusunda vitamin E düzeyleri düşük bulunmuştur (116). Karaciğerlerinde bakır biriktirilen LEC sıçanlarında yapılmış başka bir çalışmada sıçanlar E vitamini destekli diyet alanlar, kontrol grubu ve E vitaminden fakir diyet alanlar olarak üç gruba ayrıldığında en yüksek MDA düzeyi, bu vitaminden fakir diyet alanlarda tespit edilmiş ve kilo kaybı, sarılık gibi klinik belirtiler ile karaciğer enzimlerindeki yükselik de ilk önce bu grupta oluşmuştur (138). Von Herbay ve arkadaşlarının (130) hemokromatozis, alkolik karaciğer hastalığı ve Wilson'lu hastalarda yaptıkları çalışmada her üç grupta da olmakla beraber en düşük vitamin E/total lipid oranı serum serbest bakırı en yüksek olan Wilson'lu hastalarda bulunmuştur.

Ogihara ve arkadaşlarının (84) çalışmalarında Wilson'lu hastaların serumunda vitamin E düzeyleri, kontrol grubuna göre fark göstermemiştir. Kronik karaciğer hastalıklarında yapılan başka bir başka çalışmada vitamin E/Lipid oranı kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır (112).

Leo ve arkadaşları (63) kronik karaciğer hastalıklarında, normal serum vitamin E ve β -karoten düzeyleri olsa da, bu vitaminlerin düzeylerinin karaciğer dokusunda düşük olabileceğini göstermişlerdir. Çalışmamızda karaciğer dokusunda vitamin düzeylerine bakmadığımızdan vitamin E'nin oksidan strese yanıt olarak azalmadığını kesin olarak söyleyemeyiz.

Tedavinin oksidan stres ve antioksidan durum üzerine etkisi açısından incelendiğinde; düzenli tedavi alan grubun β -karoten ve vitamin C düzeyleri, sağlıklı

kontrol grubu ile benzer iken; düzensiz tedavi alan ve henüz tedavi başlanmamış olguların β -karoten ve vitamin C düzeyleri, düzenli tedavi alan hastalar ve sağlıklı kontrol grubundan anlamlı olarak düşüktü. Oksidan stres göstergeleri açısından bakıldığında düzensiz tedavi alan ve tedavi başlanmamış hastaların oluşturduğu grupta MDA değeri diğer iki gruba göre anlamlı oranda yüksekti. Bu veriler ile; Wilson hastalığı'nda düzenli tedavinin lipid peroksidasyonunu azalttığı ve oksidan hasarın azalmasına ikincil olarak da antioksidan vitamin düzeylerinin yükseldiği söylenebilir. Wilson hastalığı'nda serbest bakır artışı ve seruloplazmin düşüklüğünün her ikisi de serbest radikallere olan duyarlılığı artırır.

Plazmada artan serbest bakırın oksidan hasara ve radikal tutucu plazma antioksidanlarının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. (84,130) Çalışmamızda serbest serum bakırı çalışılmadı ancak yeni tanı alan ya da tedavilerini düzenli kullanmayan hastalarda serbest serum bakırının daha yüksek olacağı bilinmektedir (84,130). Düzenli tedavi alan grupta lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA'nın azalması, düzenli kullanılan şelasyon tedavisi ile plazma serbest bakır düzeyinin azalmasına bağlanmıştır.

Düzensiz tedavi alan ya da yeni tanı konulmuş hastaların oluşturduğu grupta saptadığımız vitamin C ve β -karoten düzeylerindeki düşüklük ve MDA' daki yükseklik, tedavi düzeni ile ilişkili olabileceği gibi bu grupta siroz evresindeki hasta sayısının (12 hasta) fazla olmasından kaynaklanabilir. Ancak kronik hepatit ve siroz evresindeki Wilson hastalarında MDA açısından fark bulamadığımız hatırlanacak olursa, tedavi ile MDA' nın düştüğü dolayısıyla vücutta bakırın azaltılmasıyla lipid peroksidasyonunun azaldığını söyleyebiliriz.

Tedavi almamış 4 Wilson'lu ve halen tedavi alan 5 Wilson'lu çocukta yapılan bir çalışmada, iki grup arasında MDA ve vitamin E düzeyleri açısından fark bulunamamıştır (84) Bu çalışmada tedavi almayan hastalarda kontrol grubuna göre vitamin C ve antioksidan kapasitenin düşük olması bizim bulgularımızla uyumludur.

Devam eden karaciğer hastalığı olanlarda çeşitli antioksidan vitaminlerle tedavinin yararı hakkında bilgi azdır (130). Bu konuda en çok E vitamini üzerinde durulmuştur. Karaciğer yağlanması olan çocuklara vitamin E desteği verilmesi ile daha önceden yüksek olan karaciğer enzimlerinin normale geldiği ancak tedavi kesildiğinde tekrar yükseldiği gözlenmiştir (62).CCl₄ ile siroz oluşturulan sıçanlarda da vitamin E desteğiyle karaciğer fonksiyonlarının düzeldiği gösterilmiştir (25). Vitamin E desteği alan sıçanların karaciğer dokusunda MDA düzeyi, vitamin E verilmeyen gruba göre daha düşük bulunmuştur (34).

Retinol ve β -karotenin antioksidan etkileri ile ilgili çeşitli kanser tiplerinde çalışmalar olmakla birlikte Wilson hastalığı'nda kullanımı ile ilgili yayına rastlamadık.

Çalışmamızda Wilson hastalığı ve diğer kronik karaciğer hastalıklarında eksikliği saptanan C vitaminin antioksidan olarak kullanımı ile ilgili de ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Antioksidan vitaminlerin olumlu etkilerinin görülebildiği doz genellikle diyetle alınabilen miktarlarının çok üstündedir. Bu nedenle özellikle çocuklarda, prooksidan etkileri de görülen C vitamini ve β -karotenin antioksidan olarak kullanıldığında doz ayarlarının iyi yapılması gerektiği belirtilmektedir (115). İyi bir antioksidan vitaminin çocuklarda ağızdan ya da rektal verilebilen , etki yeri ve

metabolizması iyi bilinen bir ilaç olması ve diğer ilaçlarla etkileşimine dikkat edilerek verilmesi gerektiği belirtilmiştir (115). Bu konudaki çalışmalarda her üç vitamin arasındaki sinerjistik etkiler de düşünülerek aralarında oluşabilecek bir dengesizliğin tüm sistemin olumsuz etkilenmesine neden olacağı da unutulmamalıdır (122).

Antioksidan vitaminlerin pek çok hastalıkta olduğu gibi, çeşitli kronik karaciğer hastalıklarında ve Wilson hastalığı'nda da varsayılan olumlu etkilerini görebilmek için karaciğer hastalığının seyri boyunca düzeyleri izlenmeli ve hastalığa etkisi üzerinde ayrıntılı çalışılmalıdır (130). Bu konudaki araştırmalardan sonuçlar elde edildikçe antioksidan vitaminlerin tedavi amaçlı kullanılmaları konusunda bilgilerimiz de daha sağlam temellere oturacaktır.

Bizim bulgularımıza göre total antioksidan kapasite hepatit evresinden itibaren etkilenmekte ancak belirgin vitamin eksikliği siroz evresinde ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu ışığında hastalığın hepatit evresinde vitaminlerin tedaviye eklenmesinin oksidan stresini azaltıcı etki gösterebileceği düşünülmüştür.

SONUÇLAR

Wilson hastalığı'nda MDA, NO, total antioksidan kapasite, vitamin E, vitamin C ve β -karoten ölçümleri ile oksidan stresin rolü ve antioksidanların durumunun incelendiği bu çalışmada:

1. Wilson hastalığı ve hasta kontrol grubunda (Wilson dışı kronik karaciğer hastalıkları), sağlıklı kontrol grubuna göre MDA ve NO değerleri anlamlı yüksek, total antioksidan kapasite ise anlamlı düşük bulundu . Vitamin C ve β -karoten düzeyleri her iki hasta grubunda da sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber; Wilson hastalığı grubunda C vitamini, hasta kontrol grubunda ise β -karoten düzeyindeki düşüklük anlamlı idi . Vitamin E/kolesterol oranlarında her iki hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında fark bulunmadı. Tüm parametrelerde, Wilson hastalığı ve hasta kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı .

Bu veriler ile etyolojiye bağlı olmaksızın kronik karaciğer hastalıklarında oksidan stresin var olduğu ve buna yanıt olarak antioksidan kapasitenin azaldığı sonucuna varıldı.

2. Wilson hastalığı'nda siroz evresindeki hastalarda, sağlıklı kontrol grubu ve hepatit evresindeki hastalara göre anlamlı oranda β -karoten düşüklüğü saptandı.

3. Vitamin C düzeyleri, sadece siroz evresindeki Wilson hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulundu .

4. Vitamin E/kolesterol düzeylerinde, hepatit evresindeki Wilson hastaları, siroz evresindeki Wilson hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında fark bulunmadı .

5. Total antioksidan kapasite, Wilson hastalarında hepatit ve siroz evresinde sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber, bu düşüklük sadece hepatit evresinde anlamlı bulundu .

Bu veri ile; hastalığın siroz evresinde ölçülemeyen antioksidanların devreye girebileceği düşünülmekle beraber, ölçüm yöntemlerine bağlı faktörlerin sonuç üzerinde etkili olabileceği sonucuna varıldı. Siroz evresinde β -karoten ve vitamin C düzeylerinin düştüğü dikkate alınarak total antioksidan kapasite ölçümünün, tek başına antioksidan durumu iyi yansıtmayacağı düşünüldü.

6. MDA ve NO değerleri; Wilson olgularında hepatit ve siroz evresinde sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptandı. Bu göstergeler açısından hastalığın hepatit ve siroz evresi arasında fark bulunmadı.

7. β -karoten ve vitamin C düzeyleri; yeni tanı konularak henüz tedavi başlanmamış grup ile düzensiz tedavi alan gruptan oluşan Wilson hastalarında, sağlıklı kontrol grubu ve düzenli tedavi alan Wilson hasta grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı .

Bu bulgu, düzenli şelasyon tedavisi ile oksidan stresin azaldığını ve buna ikincil olarak antioksidanların yükselebileceğini gösterdi. Ancak β -karoten ve vitamin C düzeylerini düşük bulduğumuz grupta siroz olgularının çoğunluğu oluşturmalarının sonuçları etkileyebileceği düşünüldü. Hastalık siroz evresine ilerlemeden tedaviye β -karoten ve vitamin C eklenmesinin yararlı olabileceği ancak bu görüşün başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

8. Vitamin E/kolesterol düzeylerinde tedavi düzenine göre yaptığımız karşılaştırmada bir farklılık saptanmadı.

9. Total antioksidan kapasite düzeylerinde tedavi düzenine göre bir farklılık saptanmadı. Her iki grupta da total antioksidan kapasite düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre düşüktü. Bu bulgu; sadece antioksidan kapasite ölçümünün, hastalığın değişik evrelerindeki antioksidan durumu değerlendirmede yeterli olmayacağını düşündürdü.

10. Henüz tedavi başlanmamış ve düzensiz tedavi alan hastaların bulunduğu Wilson hastalığı olgularında, MDA değeri düzenli tedavi alan grup ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Bu sonuç, düzenli şelasyon tedavisinin vücuttaki serbest bakır miktarını azaltarak lipid peroksidasyonunu azalttığını gösterdi.

11. NO düzeyleri tedaviden etkilenmeksizin her iki grupta da sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

ÖZET

Serbest radikallerin, kronik karaciğer hastalıklarında oluşan doku hasarında rol aldıkları çalışma ile gösterilmiştir. Genetik geçişli bir metabolik hastalık olan Wilson hastalığı da bunlardan biridir. Wilson hastalığı'nda prooksidan özellikteki bakırın serbest radikal üretimini artırarak oksidan hasara yol açtığı düşünülmektedir.

Bu çalışma; 24 Wilson Hastalığı, 25 hasta kontrol (Wilson dışı-kronik karaciğer hastalığı) ve 23 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 72 çocukta yapıldı. Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarını içeren grupta hepatit B, otoimmün ve kriptojenik karaciğer hastalığı olan hastalar bulunmakta idi. Çalışmada lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve bir serbest radikal olan NO ölçümü ile oksidan stres araştırıldı. Antioksidan durumu değerlendirmek amacıyla antioksidan özellikteki üç vitamin (vitamin E, vitamin C ve β -karoten) ile total antioksidan kapasite çalışıldı. Wilson hastalığı grubunda kronik hepatit ya da siroz evresinde bu parametreler arasında farklılık olup olmadığı araştırıldı. Tedavinin oksidan stres ve antioksidan duruma etkisini görebilmek amacıyla Wilson hastaları düzenli tedavi alan hastalar ve düzensiz tedavi alan ve henüz tanı konmuş hastalar şeklinde gruplandırılarak ölçümler karşılaştırıldı.

Elde edilen veriler sonucunda Wilson hastalığı ve Wilson dışı kronik karaciğer hastalıklarında etyolojiye bağlı olarak fark göstermeksizin oksidan stresin varlığı gösterildi. Vitamin C ve β -karoten antioksidan savunmada öne çıkan vitaminler olarak bulundu. Wilson olgularında özellikle siroz evresinde bu

vitaminlerin daha düşük seviyelerde olduğu belirlendi. Ayrıca Wilson hastalığı' nda; düzenli tedavi ile oksidan stresin azaldığı gösterildi.

Bu çalışma Wilson hastalığı'nın da içinde yer aldığı kronik karaciğer hastalıklarında oksidan stresin varlığını ve sadece total antioksidan kapasite ölçümünün antioksidan durumu gösterme konusunda yeterli olmadığını, antioksidan vitaminlerin ayrı ayrı ölçümünün önemli olduğunu gösterdi. Özellikle siroz evresinde azalan antioksidan vitaminlerin erken dönemde tedaviye eklenmesinin yararlı olabileceği düşünölmekle beraber bu konuda kapsamlı çalışmalarla daha sağlıklı verilere ulaşılabilceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Andreoli TE: Free radicals and oxidative stress. Am j Med 108: 650-651, 2000
2. Anggard E: Nitric oxide: mediatör, murderer and medicine. Lancet 343 (14): 1199-1206, 1994
3. Armstrong D, Browne R: The Analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. Adv Exp Med Biol 366: 43-58, 1994
4. Aydın A, Sayal A, Işimer A: Oksijen radikalleri ve biyolojik sistemlerdeki rolü. GATA Bülteni 39: 270-274, 1997
5. Aydın A, Işimer A: Nitrik oksid ve oksidatif stres arasındaki ilişkinin incelenmesi. Doktora tezi. Ankara, 1997
6. Balabanlı B, Arıcıoğlu A: Kobaylarda radyasyon etkisiyle oluşan nitrik oksid aracılı karaciğer harabiyetinin mekanizması, antioksidan kapasite ve A vitaminin rolünün incelenmesi. Doktora tezi. Ankara, 1999
7. Barak N, Zemel R, Ben-ari Z, Braun M, Tur-Kaspa R: Nitric oxide metabolites in decompensated liver cirrhosis. Dig Dis Sci 44 (7): 1338-1341, 1999
8. Başağa HS: Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol 68: 989-998, 1990
9. Balistreri WF: Wilson Disease: Nelson Textbook of Pediatrics. 16. baskı. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds) WB Saunders 2000, S: 1209-1210
10. Balistreri WF: Manifestation of liver disease: Nelson Textbook of Pediatrics. 16. baskı. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds) WB Saunders 2000, S: 1198-1203

11. Bast A, Van der Plas RM, Van den Berg H, Haenen GRMM: Beta carotene as antioxidant. *Eur J Clin Nutr* 50 (suppl 3): 54-56, 1996
12. Beattie AD, Sherlock S: Ascorbic acid deficiency in liver disease. *Gut* 17. (8): 571-575, 1976
13. Benjamin N, Wallance P: Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production. *Lancet* 344 (1): 960, 1994
14. Bianchi G, Marchesini G, Fabbri A, Ronchi M, Chianese R, Grossi G: Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 44: 784-788, 1997
15. Bingham MJ, Ong TJ, Ingledew WJ, Mc Ardle HJ: ATP-dependent copper transporter, in golgi apparatus of rat hepatocytes, transports Cu (II), not Cu (I). *Am J Physiol* 271 (1): 6741-6746, 1996
16. Blomhoff R: Hepatic retinol metabolism: Role of various cell types. *Nutr Rev* 45 (9): 257-263, 1987
17. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR: Transport and storage of vitamin A. *Science* 250: 399-403, 1990
18. Bomzon A, Blendis LM: The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Hepatology* 20 (5): 1343-1348, 1994
19. Brewer GJ: The treatment of Wilson' s disease. Planum Publishiers, New York 1999 S:115-126
20. Brewer GJ: Recognition, diagnosis and management of Wilson's Disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 39-46, 2000

- 21.** Brewer GJ, Dick RD, Johnson VD, Fink JK, Kluin KJ, Daniels S: Treatment of Wilson's disease with zinc XVI: Treatment during the pediatric years. *J Lab Clin Med* 137 (3): 191-198, 2001
- 22.** Britton RS, Brown KE: Genetic hemochromatosis and Wilson's disease: role for oxidant stress? *Hepatology* 21 (4): 1196-1197, 1995
- 23.** Britton RS: Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 16 (1): 3-11, 1996
- 24.** Burton GW, Ingold K: Vitamin E as in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci* 570: 7-22, 1989
- 25.** Cantürk Z, Cantürk NZ, Özbilim G, Yenisey C: Experimental cirrhosis of the liver and cytoprotective effects of alpha tocopherol. *East Afr Med J* 76 (4): 223-228, 1999
- 26.** Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez M, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodes J: Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: Role for nitric oxide. *Hepatology* 18 (2): 367-372, 1993
- 27.** Chapple ILC, Mason GI, Garner I, Matthews JB, Thorpe GH, Maxwell SRJ: Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Ann Clin Biochem* 34: 412-421, 1997
- 28.** Comporti M: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 53 (6): 599-623, 1985
- 29.** Coşkun U: Karaciğer sirozlu hastalarda serum ve asit sıvısında nitrat ve nitrit düzeyleri. Uzmanlık Tezi. Ankara, 1999
- 30.** Cox RD, Frank CW: Determination of nitrate and nitrite in blood and urine by chemiluminescence. *J Anal Toxic* 6:148-152, 1982

- 31.** Cranfield LM, Gollan JL, White AG, Dormandy TL: Serum antioxidant activity in normal and abnormal subject. *Ann Clin Biochem* 16 (6): 299-306, 1979
- 32.** Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 107: 526-545, 1987
- 33.** Danks DM: Copper and liver disease. *Eur J Pediatr* 150: 142-148, 1991
- 34.** Dikici İ, Akkuş İ: Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlede oksidatif stresin araştırılması. Uzmanlık tezi. Konya, 1999
- 35.** Diplock AT: Antioxidant nutrients and disease prevention: overview. *Am J Clin Nutr* 53: 189-193, 1991
- 36.** Drapper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Adv Exp Med Biol* 186: 421-431, 1990
- 37.** Dubey SS, Palodhi GR, Jain AK: Ascorbic acid, dehydroascorbic acid and glutathione in liver disease. *Indian J Physiol Pharmacol* 31 (4): 279-83, 1987
- 38.** Durand F, Bernuau J, Giostra E, Mentha G, Shouval D, Degott C, Valla D: Wilson's disease with severe hepatic insufficiency: beneficial effects of early administration of D-penicillamine. *Gut* 48: 849-852, 2001
- 39.** Erbaş D: Nitrik oksit: Fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü. *Klinik Gelişim* 11: 376-380, 1998
- 40.** Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A: Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp dergisi* 3: 243-250, 1992
- 41.** Ferns GA, Lamb DJ, Taylor A: The possible role of copper ions in atherogenesis. *Atherosclerosis* 135: 13-15, 1997

- 42.** Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 29 (11): 1106-1114, 2000
- 43.** Geubel AP, Galocsy CD, Alves N, Rahier J, Dive C: Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration: Estimate of dose-related toxicity in 41 cases. *Gastroenterology* 100:1701-1709, 1991
- 44.** Gordge MP: How cytotoxic nitric oxide? *Exp Nephrol* 6 (1): 12-16, 1998
- 45.** Gu M, Cooper JM, Butler P, Walker AP, Mistry PK, Dooley JS, Schapira AHV: Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 356 (5): 469-473, 2000
- 46.** Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo j, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S: Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: Relationship to endotoxemia. *Hepatology* 18 (5): 1139-1144, 1993
- 47.** Halliwell B: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 23: 1396-1397, 1984
- 48.** Halliwell B: Oxygen radicals as key mediators in neurological disease :Fact or fiction? *Ann Neurol* 32: 10-15, 1992
- 49.** Halliwell B, Chirico S: Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57 (suppl): 715-725, 1993
- 50.** Hogg N, Kalyanaraman B: Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 5;1411 (2-3): 378-84, 1999
- 51.** Honn WM, Lee KH, KhooHE: Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann NY Acad Sci* 962: 275-295, 2002

- 52.** Hoofnagle JH, Di Bisceglie A: The treatment of chronic viral hepatitis. *The New Eng J Med* 336 (5): 347-356, 1997
- 53.** Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofshet LJ, Shields PG, Billiair TR, Trautwein C, Hohler T, Galle PR: Increased p53 mutation load in non tumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci* 7; 97 (23): 1270-1275, 2000
- 54.** Is Y: Measurement of total antioxidant capacity. *J Clin Pathol* 54: 339, 2001
- 55.** Ivanova D, Yankova T, Bekyarova G: Reactive oxygen species: The universal killers? *J Pharma Sci* 24: 171-179, 1999
- 56.** Kaçmaz B, Öğüş E, Paşaoğlu H, Kılıç D, Tülek N, Bakır F: Akut ve kronik viral hepatitli hastalarda lipid peroksidasyonu ve oksidasyona direncin incelenmesi. *Viral hepatit Dergisi* 7 (3): 374-378, 2001
- 57.** Kahl R, Hildebrandt AG: Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Fd Chem Toxic* 24 (10/11): 1007-1014, 1986
- 58.** Kandemir O, Polat A, Kaya A: Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis and its relation with histological severity of disease. *J Viral Hepat* 9 (6): 419-23, 2002
- 59.** Kiechle FL, Malinski T: Nitric oxide : biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Ped* 100 (5): 567-575, 1993
- 60.** Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V: Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 54: 356-361, 2001
- 61.** Kurtel H, Gragner DN, Tso P, Grisham MB: Vulnerability of intestinal intersititial fluid to oxidant stress. *Am j Physiol* 263: 573-578, 1992

- 62.** Lavine JE: Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *J Pediatr* 136 (6): 734-738, 2000
- 63.** Leo MA, Rosman AS, Lieber CS. Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. *Hepatology* 17 (6): 977-987, 1993
- 64.** Lissi E, Salim-hanna M, Pascual C, Castillo MD: Evaluation of total antioxidant potential and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 18 (2): 153-158, 1995
- 65.** Loguercio C, Federico A: Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 34 (1): 1-10, 2003
- 66.** Look MP, Reichel C, Von Falkenhausen M, Hahn C, Stockinger K: Vitamin E status in patients with liver cirrhosis: normal or deficient? *Metabolism* 48 (1): 86-91, 1999
- 67.** Loudianos G, Gitlin JD: Wilson's disease. *Semin Liver Dis* 20 (3): 353-363, 2000
- 68.** Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120: 227-237, 1994
- 69.** Mansouri A, Gaou I, Fromenty B, Letteron P, Berson A, Degott C, Erlinger S, Pessayre D: Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in Wilson's disease. *Gastroenterology* 113: 599-605, 1997
- 70.** McCay PB: Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 5: 323-340, 1985
- 71.** Martin PY, Gines P, Schrier RW: Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis. *New Eng J Med* 339 (8): 533-541, 1998

- 72.** Mc Cormic DB: Methods for determination of ascorbic acid. Textbook of clinical Chemistry. Birinci baskı Norbert W Tietz (ed). WB Saunders 1986, S: 960-962
- 73.** Mc Cormic DB: Vitamins. Textbook of clinical Chemistry. Birinci baskı. Norbert W. Tietz (ed). WB Saunders 1986, S: 932-936
- 74.** Miller NJ, Rice Evans C, Davies MJ, Milner A: Total antioxidant status. Clin Sci 84: 407-412, 1993
- 75.** Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrite and nitrate: NO: Biology and chemistry 5 (1): 62-71, 2001
- 76.** Mizutani T, Layon AJ: Clinical applications of nitric oxide. Chest 110 (82): 506-524, 1996
- 77.** Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharm Rev 43 (2): 109-135, 1991
- 78.** Motchnik PA, Frei B, Ames BN: Measurement of antioxidants in human plasma. Adv Exp Med Biol Med 234: 269-293, 1994
- 79.** Moussa YI, Plevris JN, Hayes PC: Plasma nitrites /nitrates in HCV infection and hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol 12 (2): 159-63, 2000
- 80.** Nair J, Carmichael PL, Fernando RC, Philips DH: Lipid peroxidation induced etheno DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson disease and hemochromatosis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7:440, 1998

81. Newsome PN, Beldon I, Moussa Y, Delahoke TE, Pouloupoulos G, Hayes PC: Low serum retinol levels are associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14 (10): 1295-1301, 2000
82. Niki E: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44: 227-253, 1987
83. Niki E, Noguchi N: Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life* 50: 323-329, 2000
84. Ogihara H, Ogihara T, Miki M, Yasuda H, Mino M: Plasma copper and antioxidant status in Wilson's disease. *Pediatr Res* 37 (2): 219-226, 1995
85. Özcan MA, Tankurt E: Kronik karaciğer hastalıklarında serum nitrit, nitrat düzeyleri. Uzmanlık tezi. İzmir, 1997
86. Palabıyıköğlu M, Sipahi N: Karaciğer sirozunda serum β -karoten ve retinol düzeyleri Uzmanlık tezi. Ankara, 1994
87. Pandit A, Bavdekar A, Bhav S: Wilson's disease. *Ind J Ped* 69: 785-791, 2002
88. Pietrangelo A: Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 16 (1): 13-30, 1996
89. Pitkanen OM, Holman M, Anderson S: Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Pediatr Res* 29 (1): 56-59, 1991
90. Poli G, Albano E, Dianzani MU: The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 45: 117-142, 1987
91. Poli G: Liver damage due to free radicals. *Br Med Bullet* 49 (3): 604-620, 1993
92. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H: Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med* 30 (5): 456-462, 2001

- 93.** Prior RL, Cao G: In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27 (11/12): 1173-1181, 1999
- 94.** Rice Evans C, Burdon R: Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Int Rev Res* 32 (1):71-110, 1993
- 95.** Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26 (9/10): 1231-1237, 1999
- 96.** Rindi G: A rapid calorimetric method for determination of tocopherol acetate and tocopheryl acetate in plasma. *Int Rev Vit Res*; 28: 225, 1958
- 97.** Robertson WM: Wilson's disease. *Arch Neurol* ; 57: 276-277, 2000
- 98.** Rocchi E, Athos B, Paolillo F, Pradelli M, Casalgrandi G: Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis. *J Lab Clin Med* 118 (2): 176-185, 1991
- 99.** Rodo M, Ozonkowska A, Pulawska M, Tarnacka B, Wehr H: The level of serum lipids, vitamin E and low density lipoprotein oxidation in Wilson's disease patients. *Eur J Ped* 7: 491-494, 2000
- 100.** Sanz-Cameno P, Medina J, Garcia-Sanches A, Borque MJ, Martin-Vilches S, Gamello C, Jones EA, Moreno-Otero R: Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol*: 37 (6): 723-9, 2002
- 101.** Saran M, Bors W: Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin Wochenschr* 69: 957-964, 1991
- 102.** Schapira AH: Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Inherit Metab Dis* 25 (3): 207-214, 2002

- 103.** Scheinberg IH, Sternlieb I: Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am J Clin Nutr* 63: 842-845, 1996
- 104.** Schwab SG, Scherer J, Wildenauer DB: Presymptomatic testing in families with Wilson's disease. *Lancet* 343 (25): 1637-1639, 1994
- 105.** Seven A, Candan G: Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa J Med* 27: 41-50, 1996
- 106.** Shaw S, Jayatilleke E, Lieber CS: Lipid peroxidation as a mechanism of alcoholic liver injury. *Alcohol* 5:135-140, 1988
- 107.** Shneider BL, Suchy FJ: Chronic hepatitis: Nelson Textbook of Pediatrics.16. baskı. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds) WB Saunders 2000, S: 1216-1218
- 108.** Sies H: Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 965-968, 1991
- 109.** Sies H, Stahl W, Sundquist AR: Antioxidants functions of vitamins E and C, Beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 30: 669: 7-20, 1992
- 110.** Sies H: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219, 1993
- 111.** Sokol RJ. Antioxidant defenses in metal- induced liver damage. *Semin Liver Dis* 16 (1): 39-46, 1996
- 112.** Sokol RJ, Balistreri WF, Hoofnagle JH, Jones EA: Vitamin E deficiency in adults with chronic liver disease. *Am J Clin Nutr* 41 (1): 66-92, 1985
- 113.** Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brain K, Khandwala RA, Loehr JP: Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology* 105 (1): 178-187, 1993

114. Sokol RJ, Devereaux MW, Traber MG, Shikes RH: Copper toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: Effect of vitamin E. *Pediatr Res* 25 (1): 55-62, 1989
115. Sokol RJ, Hoffenberg EJ: Antioxidants in pediatric gastrointestinal disease. *Ped Gastr* 43 (2): 471-486, 1996
116. Sokol RJ, Twedt DT, Mckim JM, Devereaux MW, Karrer FM: Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington Terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology* 107: 1788-1798, 1994
117. Song YM, Chen MD: A single determination of liver copper concentration may misdiagnose Wilson's disease. *Clin Biochem* 33 (7): 589-590, 2000
118. Sökücü S: Wilson hastalığı: Pediatri I-II. Üçüncü baskı. Neyzi O, Ertuğrul T(eds) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002, S: 848-851
119. Sökücü S: Siroz: Pediatri I-II. Üçüncü baskı. Neyzi O, Ertuğrul T (eds) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002, S: 841-848
120. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, Herneth H : Wilson's disease in patients presenting with liver disease: A diagnostic challenge. *Gastroenterology* 113: 212-218, 1997
121. Stremmel W, Meyerrose KW, Niederau C, Heftner H: Wilson disease: Clinical presentation, treatment, and survival. *Ann Int Med* 115: 720-726, 1991
122. Tanakol R: Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik Gelişim* 11: 347-357, 1998
123. Tuna R, Çağlayan B: Nitrik oksid-II; Fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü. *Sendrom* 4(2): 54-59, 1995

124. Uchiyama M, Mihara M: Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Ann. Biochem.* 86: 271-278, 1978
125. Umur N, Kırkalı G: Kronik karaciğer hastalıklarında nitrik oksidin önemi ve değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi. İzmir, 1997
126. Uysal M: Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 11: 336-341, 1998
127. Ünal D: Serbest radikaller. *Sendrom* 2 (4): 68-80, 1999
128. Vallance P, Moncada S: Hyperdynamic circulation in cirrhosis: A role for nitric oxide? *Lancet* 337: 776-778, 1991
129. Van Den Berg GJ, Lemmens AG, Beynen AC: Copper status in rats diets supplemented with either vitamin E, vitamin A, or β -Carotene. *Biol Trace Elem Res* 37: 253-259, 1993
130. Von Herbay A, Groot H, Hegi U, Stremmel W, Strohmayer G, Sies H: Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *J Hepatology* 20: 41-46, 1994
131. Walshe JM: Diagnosis and treatment of presymptomatic Wilson's disease. *Lancet* 20: 435-437, 1988
132. Warner BB, Wispe JR: Free radical-mediated disease in pediatrics. *Semin Perinatol* 16 (1): 47-57, 1992
133. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A: Metabolism and excretion of nitric oxide in humans: An experimental and clinical study. *Circ Res* 73 (6): 1121-1127, 1993
134. Wilson DC, Phillips MJ, Cox DW: Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J Pediatr* 137 (5): 719-721, 2000

- 135.** Yagi K: Lipid peroxides and human disease. *Chem Phys Lipids* 45: 337-351, 1987
- 136.** Yalçın S: Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 11: 342-346, 1998
- 137.** Yamamoto Y, Yamashita S, Fujisawa A: Oxidative stress in patients with hepatitis , cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun* 9; 247 (1): 166-170, 1998
- 138.** Yamazaki K, Ohyama H, Kurata K, Wakabayashi T: Effects of vitamin E on clinical course and plasma glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase activities in hereditary hepatitis of LEC rats. *Lab. Anim. Sci.* 43 (1): 61-67, 1993
- 139.** Yarze JC, Martin P, Munoz SJ, Freidman LS: Wilson's disease: Current status. *Am j Med* 92: 643-54, 1992
- 140.** Yarze JC: The mechanisms of penicillamine, trientine, and zinc in the treatment of Wilson's disease. *Am J Gastroent* 90(6): 1026, 1995
- 141.** Yıldırım T, Demirağ F. Akut ve kronik viral hepatitlerde total antioksidan kapasite ve lipid peroksid düzeyleri. *Viral Hepatit Dergisi* (1): 51-53, 1998
- 142.** Young AJ, Lowe GM: Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arc Biochem Biophys* 385 (1): 20-27
- 143.** Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callender ME, Trimble ER: Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary hemochromatosis. *Free Radic Biol Med* 16: 393-397, 1994
- 144.** Yüce A, Koçak N, Özen H, Gürakan F: Wilson's disease patients with normal ceruloplasmin levels. *Turk J Ped* 41: 99-102, 1999

- 145.** Yüce A, Koçak N, Demirtaş M, Özen H, Özgüç M: DNA haplotype analysis for the diagnosis of Wilson disease in siblings. *Acta Pediatr* 89: 1142-1144, 2000
- 146.** Yüce A, Koçak N, Gürakan F, Özen H: Wilson's disease presented with fulminating hepatic failure in children. *Dig Dis Sci* 45 (4): 704, 2000



EK TABLO 1: Wilson Hastalığı grubunun özellikleri ve laboratuvar sonuçları

No	Yaş (yıl)	K/E	Kr.Hepatit/ Siroz	Tedavi düzeni	Kolest. (mg/dl)	Vit C (mg/dl)	VitE/kolest. (mg/L)	β -karoten (µg/dl)	Tot.Ant.Kap. (mmol/L)	MDA (nmol/ml)	NO (µmol/L)
1	21	K	siroz	düzensiz	137	0.91	0.137	68.74	3.31	10.4	23.747
2	25	E	siroz	düzensiz	152	0.91	0.101	69.76	11.29	6.2	10.908
3	11	E	siroz	düzenli	100	2.14	0.126	156.97	1.78	4.4	11.446
4	18	E	siroz	düzenli	145	0.73	0.095	172.36	2.10	3.4	14.460
5	8	E	hepatit	düzenli	154	1.42	0.099	240.08	1.09	4.4	59.127
6	10	E	hepatit	düzenli	193	1.78	0.102	231.37	2.59	4.4	25.380
7	11	K	hepatit	düzenli	129	2.36	0.097	174.42	1.87	7.2	19.971
8	9	K	hepatit	düzenli	157	0.81	0.075	123.12	1.21	1.4	19.156
9	7	K	siroz	yeni tanı	38	1.72	0.081	36.93	1.35	2.0	2.644
10	7	K	siroz	yeni tanı	51	1.01	0.044	40.01	2.30	2.0	3.316
11	20	E	siroz	düzenli	169	0.86	0.082	101.57	1.90	7.0	30.743
12	13	E	hepatit	düzenli	156	1.26	0.092	173.39	1.22	2.6	23.158
13	7	K	hepatit	düzenli	159	0.57	0.068	154.92	0.89	1.8	18.025
14	10	E	siroz	düzensiz	136	0.59	0.113	103.62	1.79	1.8	48.200
15	8	E	siroz	yeni tanı	106	0.65	0.090	32.92	0.57	2.4	14.773
16	9	K	hepatit	düzenli	139	0.96	0.082	170.31	1.10	3.0	9.324
17	11	E	siroz	düzensiz	173	0.77	0.077	129.27	1.39	2.0	35.708
18	8	K	siroz	yeni tanı	59	0.63	0.108	75.92	0.92	2.4	59.980
19	17	K	siroz	düzensiz	98	0.88	0.110	101.57	1.21	2.8	4.126
20	15	E	siroz	düzensiz	180	1.37	0.112	167.23	0.60	2.4	50.680
21	13	E	hepatit	düzenli	166	1.37	0.132	238.0	0.92	1.4	10.540
22	10	K	hepatit	yeni tanı	169	0.74	0.055	68.74	0.91	13.2	27.487
23	7	E	siroz	yeni tanı	85	0.72	0.066	79.00	1.57	12.6	57.570
24	6	K	siroz	yeni tanı	34	0.52	0.125	97.47	2.68	9.8	71.763

EK TABLO II: Wilson Dışı Kronik Karaciğer hastalığı (hasta kontrol) grubunun özelliklikleri ve laboratuvar sonuçları

No	Yaş (yıl)	K/E	Etyoloji	Kr. Hepatit/ Siroz	Kolest. (mg/dl)	Vit C (mg/dl)	VitE/kolest. (mg/L) (mg/L)	β -karoten (µg/dl)	Tot.Ant.Kap. (mmol/L)	MDA (nmol/ml)	NO (µmol/L)	Nitrat (µmol/L)
1	9	E	HepatitB	hepatit	103	0.65	0.133	200.07	0.93	1.2	15.879	14.436
2	9	K	HepatitB	hepatit	131	0.88	0.083	145.69	1.52	2.8	12.819	11.688
3	16	K	otoimmün	siroz	113	0.36	0.120	76.95	1.08	1.4	27.015	24.863
4	13	E	HepatitB	hepatit	146	2.01	0.114	69.76	1.78	3.2	0.928	0.148
5	11	E	HepatitB	hepatit	163	1.01	0.105	44.11	1.19	5.2	14.960	13.564
6	11	K	kriptojenik	siroz	130	1.24	0.110	92.34	0.74	1.8	69.139	65.684
7	15	E	HepatitB	hepatit	39	0.67	0.317	153.9	0.86	2.8	18.567	17.655
8	4	E	kriptojenik	siroz	83	0.59	0.141	84.13	1.05	3.2	88.658	82.929
9	11	E	HepatitB	hepatit	160	0.52	0.061	139.53	1.11	3.2	11.126	10.070
10	15	K	HepatitB	hepatit	172	0.31	0.061	267.71	1.42	1.8	8.443	5.366
11	6	E	HepatitB	hepatit	147	1.62	0.112	162.10	1.72	5.2	15.202	14.125
12	12	E	HepatitB	hepatit	134	0.36	0.126	151.84	0.42	1.4	12.234	10.062
13	9	E	HepatitB	hepatit	135	0.56	0.138	24.14	1.16	7.2	10.491	5.839
14	10	K	otoimmün	siroz	154	1.60	0.089	96.44	0.70	1.6	6.080	3.522
15	15	K	otoimmün	siroz	141	1.11	0.101	135.43	1.18	2.8	8.915	7.636
16	15	K	HepatitB	hepatit	163	1.86	0.079	117.99	1.66	3.2	12.027	9.879
17	13	K	HepatitB	hepatit	137	1.60	0.083	91.31	1.23	3.6	22.912	21.735
18	10	E	HepatitB	hepatit	160	1.91	0.079	106.70	0.50	6.2	12.846	8.190
19	14	E	HepatitB	hepatit	162	0.77	0.071	186.73	1.08	4.8	17.319	16.298
20	12	K	otoimmün	siroz	115	1.32	0.105	87.21	1.75	4.8	15.908	12.851
21	5	E	HepatitB	siroz	79	0.72	0.084	56.43	1.94	2.8	72.840	71.433
22	13	K	otoimmün	siroz	147	1.34	0.091	111.83	1.30	4.8	15.779	13.151
23	17	K	otoimmün	siroz	134	0.49	0.081	123.12	1.33	5.6	10.487	9.333
24	14	K	otoimmün	siroz	115	1.59	0.091	159.03	0.64	1.4	20.748	19.325
25	17	K	otoimmün	siroz	122	1.14	0.101	107.73	0.40	2.2	18.174	16.728

EK TABLO III: Sağlıklı kontrol grubunun özellikleri ve laboratuvar sonuçları

No	Yaş (yıl)	K/E	Kolest. (mg/dl)	Vit C (mg/dl)	VitE/kolest. (mg/L)	β -karoten (μg/dl)	Tot.Ant.Kap. (mmol/L)	MDA (nmol/ml)	NO (μmol/L)
1	14	E	101	0.95	0.106	131.32	2.04	0.8	1.287
2	8	E	135	1.40	0.086	152.87	1.40	2.8	0.387
3	6	K	129	1.52	0.075	283.17	1.69	4.8	3.003
4	9	K	140	0.77	0.078	120.04	1.76	4.6	11.177
5	15	K	122	0.90	0.077	69.76	1.37	1.6	11.446
6	14	E	104	0.95	0.107	101.57	2.01	1.2	13.728
7	11	K	123	1.14	0.090	170.31	1.69	6.8	15.444
8	6	K	102	1.26	0.204	106.70	1.47	1.6	6.251
9	13	E	106	1.26	0.095	104.65	2.04	2.0	9.750
10	8	K	178	1.85	0.168	158.0	1.91	1.4	10.728
11	11	K	171	1.03	0.124	126.19	2.29	2.8	15.077
12	9	E	133	1.16	0.099	141.58	1.29	0.6	20.517
13	11	E	145	1.18	0.086	151.84	2.14	0.4	9.360
14	8	E	100	1.18	0.129	215.46	1.07	5.0	6.860
15	16	K	141	1.01	0.100	160.05	2.38	0.8	15.022
16	8	K	166	2.31	0.121	174.42	1.90	4.4	14.367
17	12	K	132	1.83	0.092	110.80	2.49	0.6	3.724
18	14	E	170	1.22	0.100	113.88	3.22	2.4	11.193
19	8	K	160	2.49	0.110	177.97	2.67	1.4	9.894
20	10	E	150	0.95	0.147	231.87	1.79	1.8	10.015
21	7	E	120	0.78	0.075	113.88	1.67	2.0	9.040
22	8	E	123	1.54	0.103	178.52	1.90	1.2	7.374
23	8	E	138	2.11	0.082	212.38	2.20	3.4	10.70