

## İNFEKSİYÖZ MONONÜKLEOZLU HASTALARDA SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİ

### SERUM CYTOKINE LEVELS IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Emine YEŞİLYURT<sup>1</sup>, Murat DİZBAY<sup>2</sup>, Seda USTA<sup>1</sup>, Işıl FİDAN<sup>1</sup>

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

<sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup>Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

**Anahtar Sözcükler:** Epstein-Barr Virus, infeksiyöz mononükleoz, sitokin

**Keywords:** Epstein-Barr Virus, infectious mononucleosis, cytokine

Geliş: 18 Haziran 2009

Kabul: 22 Temmuz 2009

## ÖZET

Epstein-Barr Virus (EBV) Herpesvirus Ailesi'nde yer alan infeksiyöz mononükleozu neden olan bir virustur. Hastalığın patogenezinde sitokin yanıtının rolünü belirlemek için, infeksiyöz mononükleozlu hastaların serum örneklerinde sitokin düzeyleri araştırılmıştır. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- $\alpha$ ), İnterferon-Gama (IFN- $\gamma$ ) İnterlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-10 ve Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) düzeyleri Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) yöntemi ile belirlenmiştir. IL-1, IL-2 ve IFN- $\gamma$  serum düzeyleri akut EBV infeksiyonlu hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeylerde yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde TNF- $\alpha$  düzeyleri de kontrollerden yüksek bulunmuş ancak artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. IL-10 ve TGF- $\beta$  konsantrasyonlarında iki grup arasında bir fark gözlenmemiştir. Çalışmamızın verilerine göre, infeksiyöz mononükleoz patogenezinde sitokinler önemli bir role sahip olabilir.

## SUMMARY

Epstein-Barr virus (EBV) is a member of the Herpesvirus Family and the causative agent of infectious mononucleosis. Cytokine concentrations in serum samples taken from patients with infectious mononucleosis were measured in order to identify the cytokines responsible for the pathogenesis of the disease. The concentrations of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ), Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) Interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-10, and Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) were measured using an Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA). It was found that the serum levels of IL-1, IL-2, and IFN- $\gamma$  were significantly high in patients with acute EBV infection compared with the serum levels in healthy controls. Similarly, the levels of TNF- $\alpha$  increased compared to the controls, but the increase was not statistically significant. No significant difference in IL-10 and TGF- $\beta$  concentrations was found between the two groups. The data in this study suggest that cytokines may have a critical role in the pathogenesis of infectious mononucleosis.

## GİRİŞ

Epstein-Barr Virus (EBV), insanda yaşam boyu persistan olarak kalabilen B lenfotropik bir herpes virustur (1, 2). Dünyada yaygın olarak görülen bir infeksiyondur ve virus tükürük, boğaz salgılarıyla çıkarılarak yakın temas, kan ve kontamine eşyalarla bulaşmaktadır. Ülkemizde de yüksek oranda seropozitiflik vardır (3). Akut infeksiyöz mononükleoz etkeni olan bu virus, latent infeksiyonlara neden olur. Ayrıca, B hücreli lenfoma, nazofarenks

kanseri, Burkitt lenfoma gibi kanserlerle ilişkilidir. İnfeksiyöz mononükleoz, EBV'nin kendi kendini sınırlayan primer enfeksiyonudur (4). Primer EBV enfeksiyonu genellikle çocukluk ve adolesan dönemde geçirilir (5). Virus, enfeksiyon sonrası vücutta yaşam boyu persistan halde kalmaktadır.

İmmünolojik kontrol mekanizmaları, EBV primer enfeksiyonu sonrası önem taşımakta ve bu mekanizmalarda oluşacak bozukluklar reaktivasyona ve özellikle immün-

supresif hastalarda fulminan infeksiyonlara yol açmaktadır (4). Epstein-Barr Virus infeksiyonu sonrası gelişen immün yanıt oldukça karmaşıktır. Hem sıvısal hem de hücrel immün mekanizmalar etkili olabilmektedir. Epstein-Barr Virus infeksiyonunun kontrolünde, hücrel immün yanıt daha önemli rol oynamaktadır (6).

Sitokinler, vücutta hücreler arasındaki iletişimde önemli rol oynayan proteinlerdir. İnfeksiyon sırasında immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde önemli etki gösterirler (7). Sitokinlerin pek çok infeksiyon hastalığının oluşumundaki rolü yanında, akut EBV infeksiyonunun patofizyolojisinde de etkili olduğu düşünülmektedir (6). Pek çok EBV geninin, konakta hasar oluşturmadan, apoptotik sinyalleri ve sitokin dengesini düzenleyerek B hücrelerini persistan olarak infekte etmeyi sağladığı kabul edilmektedir (2). Aynı zamanda, EBV infeksiyonu gibi faktörlere bağlı olarak oluşan kronik inflamasyonun kanser oluşumundaki etkisinde, inflamasyonda etkin rol oynayan sitokinlerin aracı olabilecekleri de düşünülmektedir (8).

Bu çalışmada, serolojik ve klinik olarak akut EBV infeksiyonu olduğu düşünülen hastalardan alınan serum örneklerinde sitokin düzeylerinin araştırılması ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması ve bu şekilde akut infeksiyonun patogenezinde sitokinlerin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Çalışma grubu

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesine Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran ve ateş, boğaz ağrısı, lenfadenopati şikayetleri olup da serolojik incelemeleri sonrasında akut EBV infeksiyonu tanısı alan 22 hasta çalışma kapsamına alınmıştır. Hastaların 14 tanesi kadın, sekiz tanesi erkek idi. Hastalara ait yaş dağılımı 12-31 (ort. 19.8) yaşları arasındaydı. İnfeksiyöz mononükleoz tanısı; farenjit, ateş, servikal lenfadenopati, periferik yaymada atipik lenfositlerin görülmesi ve serolojik olarak EBV VCA IgM (EBV Viral Capsid Antigen) ve/veya EBV VCA IgG antikorlarının varlığı ve EBNA (Epstein Barr nuclear antigen) antikorlarının bulunması ile konulmuştur (5). Kontrol grubu olarak, aynı yaş grubunda olan 20 sağlıklı gönüllüden serum örnekleri toplanmıştır. Hasta ve kontrollerden alınan periferik venöz kan örnekleri santrifüj edildikten sonra serumları ayrılmış ve serum örnekleri çalışılincaya kadar -80° C'de saklanmıştır.

### Serolojik çalışma

Hastalarda EBV VCA IgM, EBV VCA IgG ve EBV EBNA antikorları Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuçlar 450 nm'de ELISA okuyucusunda okunarak, cut-off değerlerine göre hasta örneklerine ait sonuçlar belirlenmiştir.

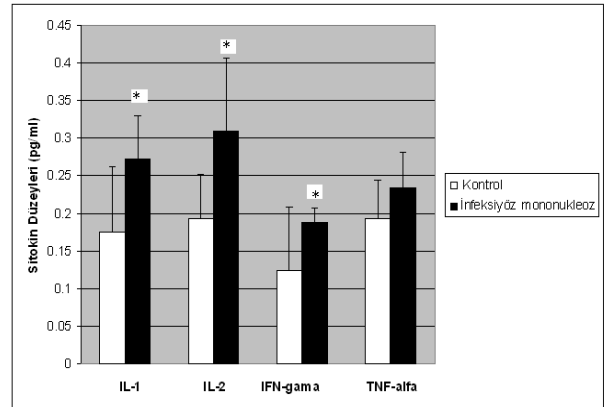
Klinik ve serolojik olarak infeksiyöz mononükleoz tanısı konulan hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan alınan serum örneklerinde İnterlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-10, Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- $\alpha$ ), İnterferon-Gama (IFN- $\gamma$ ), Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) sitokin düzeyleri ELISA yöntemi ile serolojik test kiti kullanılarak firmanın önerileri doğrultusunda araştırılmıştır (Biosource). Sonuçlar, ELISA okuyucusunda (Biotek) 450 nm'de okularak absorbans değerleri elde edilmiş ve sitokin standartları kullanılarak standart eğri elde edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarına ait sitokin düzeyleri standart eğriye göre hesaplanmıştır.

### İstatistiksel analiz

Grupların karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Akut EBV infeksiyonu bulunan hastalarda, serum IL-1, IL-2 ve IFN- $\gamma$  düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde yüksek olarak bulunmuştur ( $p$  değeri sırasıyla 0.028; 0.028; 0.021). Tümör nekrozis faktör-alfa düzeyleri akut EBV infeksiyonu geçiren bireylerde sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş olsa da iki grup arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).



Şekil 1. İnfeksiyöz mononükleozlu hasta ve sağlıklı kontrol grubunda serum sitokin düzeyleri (ortalama  $\pm$ SD) \*:  $p < 0.05$ .

Akut EBV infeksiyonu olan hasta grubunda, IL-10 ve TGF- $\beta$  sitokin düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır.

İnfeksiyöz mononükleozlu hasta ve sağlıklı kontrol grubunda serum sitokin düzeyleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Epstein-Barr Virus, immün sistem hücrelerine tropizm gösterir ve oluşturduğu infeksiyonlar belirgin immünomodulatör etkilere yol açar (9). Epstein-Barr Virus infeksiyonlarına hücrel yanıt, sitokin üretimini de içeren efektör mekanizmalara bağlı olarak gerçekleşmektedir. Sitokinler, EBV infeksiyonunun patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Epstein-Barr Virus infeksiyonuna immün yanıt sırasında virus ve sitokin ağı arasında çeşitli etkileşimler olmaktadır. Epstein-Barr Virus, immün hücrelerle etkileşime girebilmekte ve böylece konak immün yanıtında sitokin aktivasyonu ve dengesi üzerinde değişikliklere yol açabilmektedir (1).

Akut EBV infeksiyonunda görülen sitokin yanıtı değişikliklerini belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızda, akut infeksiyöz mononükleoz tanısı alan hastaların serum örneklerinde IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  düzeyleri sağlıklı kontrol örneklerine göre, daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. TNF- $\alpha$  düzeyleri dışında diğer sitokinlerin seviyeleri, infeksiyöz mononükleozlu hastalarda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde yüksek bulunmuştur. İnfeksiyöz mononükleozlu grupta antiinflamatuvar sitokinlerden olan IL-10, TGF- $\beta$  düzeyleri, sağlıklı kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Bu verilere göre, akut EBV infeksiyonu sırasında özellikle Th1 tip proinflamatuvar sitokin yanıtında bir artış olduğu gözlenmiş ve dolayısıyla infeksiyöz mononükleoz sırasında görülen değişikliklerde, inflamasyonda etkin rol oynayan sitokinlerin varlığının önemli faktörlerden biri olabileceği düşünülmüştür.

Okano ve ark. (10) fatal infeksiyöz mononükleoz (FIM) hastalarında, serum IL-4, IFN- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  düzeylerinde artış olduğunu, IL-2 düzeylerinde ise ılımlı bir yükselişin gözlendiğini, TNF- $\alpha$  düzeylerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğin olmadığını bildirmişler, özellikle IFN sisteminde görülen anormalliğin, FIM gelişiminde etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda FIM gelişen tablo olmadığından bir karşılaştırma yapmak mümkün değildir, ancak genel olarak sitokin

profilindeki değişikliklerin infeksiyöz mononükleozun klinik tabloları üzerine etkili olabileceği öngörülebilir.

Whittingham ve ark. (11) EBV ile infekte periferik kan mononükleer hücrelerinde tespit edilebilir bir TNF- $\alpha$  düzeyi belirlemezken, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 ve granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) düzeylerinde infekte olmamış örneklere göre artış saptamışlardır.

Hornef ve ark. (9) infeksiyöz mononükleoz tanısı almış hastalarda *in vivo* olarak IL-2, IL-6, soluble-IL-2R ve IFN- $\gamma$  düzeylerinde artış saptamışlar ve monositlerin akut infeksiyöz mononükleoz sırasında aktive olduğunu, monosit ve monositten türemiş faktörlerin infeksiyöz mononükleoz patogeneğinde önemli rol oynayabileceklerini bildirmişlerdir.

Attarbaschi ve ark. (13) infeksiyöz mononükleozlu sekiz hastanın T lenfosit alt gruplarında hem CD4 hem de CD8 T hücrelerinde akut EBV infeksiyonu sırasında IFN- $\gamma$  üretiminin arttığını belirlemişlerdir.

İnflamatuvar reaksiyonlarda etkin rol oynayan sitokinlerin, akut EBV infeksiyonu sırasında oluşan semptomlardan sorumlu oldukları düşünülmekle birlikte, EBV ile ilişkili hemofagositik sendrom gibi tablolarda, bir sitokin fırtınasının olduğu ve bunun koagülopati ve çoklu organ yetmezliğine neden olduğu belirlenmiştir (12). Sitokin profilinde oluşan değişiklikler ayrıca EBV'nin tümör gelişimindeki rolünde de etkin olabilir. IL-10 ve IFN- $\gamma$  arasındaki dengenin EBV ile ilişkili malignitelerin gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (13). Ho ve ark. (14) IL-10 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin, EBV pozitif periferik T hücre lenfomasında ekspresyon edildiklerini belirlemişlerdir.

Primer EBV infeksiyonu sırasında oluşan sitokin profilindeki değişiklikler muhtemelen infeksiyon sırasında görülen ateş, akut faz proteinlerin artışı gibi klinik semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (9). Dolayısıyla sitokin sentezinin akut EBV infeksiyonuna karşı gelişen inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak, sitokinlerin latent EBV infeksiyonunda ve EBV ile ilişkili malignitelerde oynadıkları rolün belirlenmesi de önem taşımaktadır. Bundan sonraki çalışmalarımız, latentlik gelişimi ve EBV ile ilişkili malignitelerde sitokin profilindeki değişikliklerin etkisi üzerine yoğunlaşacaktır. Ancak yine de, akut EBV infeksiyonu sırasında özellikle pro-inflamatuvar sitokin yanıtında bir artış olduğunun belirlenmiş olması, sitokin-

lerin özellikle immünsüpresif hastalarda gelişen EBV infeksiyonunun tedavisinde ve önlenmesinde uygun bir hedef olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, EBV infeksiyonundaki sitokin yanıtında görülen değişikliklerin tam

olarak anlaşılması, EBV ile ilişkili malignitelerin gelişimindeki rollerinin belirlenmesini de sağlayabilecektir.

#### KAYNAKLAR

1. Nilsson C, Larsson Sigfrinius AK, Montgomery SM, et al. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus are differentially associated with numbers of cytokine-producing cells and early atopy. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 509-17.
2. Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2002; 44: 203-15.
3. Fidan I, Yüksel S, İmir T. Değişik yaş gruplarında Epstein-Barr Virus antikorlarının araştırılması. *İnfek Derg* 2005; 19: 453-6.
4. Mathias WH, Wagner HJ, Kruse A, Kirchner H. Cytokine production in a whole-blood assay after Epstein-Barr Virus infection *in vivo*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 209-13.
5. Chan CW, Chiang AKS, Chan KH, Lau ASY. Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis in Chinese children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 974-8.
6. Mansoori SD, Shahgasempour S. Proliferation of cytotoxic and activated T cells during acute Epstein-Barr Virus induced infectious mononucleosis. *Acta Med Iranica* 2002; 40: 6-10.
7. Eckmann L, Kagnolf MF. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microb Infect* 2001; 3: 1191-200.
8. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: A cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma?. *Exp Hematol* 2006; 34: 399-406.
9. Hornef MW, Wagner HJ, Kruse A, Kirchner H. Cytokine production in a whole blood assay after Epstein-Barr Virus infection *in vivo*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 209-13.
10. Okano M, Thiele GM, Purtilo DT. Variable presence of circulating cytokines in patients with sporadic or X-Linked lymphoproliferative disease with fatal infectious mononucleosis. *Ped Hematol Oncol* 1993; 10: 97-9.
11. Whittingham S, Naselli G, Harrison LC, Boyd AW, Cebon J, Jack I. Cytokine production in response to Epstein-Barr virus infection of peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Immunol Cell Biol* 1993; 71: 259-64.
12. Yamastita N, Kimura H, Morishima T. Virological aspects of Epstein-Barr Virus infections. *Acta Med Okayama* 2005; 59: 239-46.
13. Attarbaschi T, Willheim M, Ramharter M, et al. T cell cytokine profile during primary Epstein-Barr virus infection (infectious mononucleosis). *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 34-9.
14. Ho JWY, Liang RHS, Srivastava G. Differential cytokine expression in EBV positive peripheral T cell lymphomas. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1999; 52: 269-74.

#### İLETİŞİM

Doç. Dr. Işıl FİDAN  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
ANKARA  
e-posta: isilfidan@yahoo.com