

KRONİK HEPATİT B TAŞIYICILARININ İMMUNOLOJİK GÖSTERGELERİ

IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN CHRONIC HEPATITIS B CARRIERS

Turan GÜNDÜZ¹ Tamer ŞANLIDAĞ² Beril ÖZBAKKALOĞLU²
Necil KÜTÜKÇÜLER³

¹ Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Manisa

² Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediyatrik İmmunoloji Bilim Dalı, İzmir

Anahtar Sözcükler: Hepatit B Virus, hepatitis B taşıyıcıları, nötrofil, nötrofil burst test, immunglobulinler

Keywords: Hepatitis B Virus, hepatitis B carriers, neutrophils, neutrophil burst test, immunoglobulins

Geliş: 09 Eylül 2005

Kabul: 04 Ekim 2005

ÖZET

Hepatit B virüsünün (HBV) direkt sitopatik hasar oluşturarak değil, immünolojik değişikliklere yol açarak etki gösterdiği öne sürülmüştür. Akut hepatit B enfeksiyonu geçiren, immün yanıtı yetersiz hastalarda kronik enfeksiyon gelişir. Bu çalışmada, kronik HBV taşıyıcısı olan hastalarda serum immunoglobulin (Ig) düzeylerinin ve nötrofillerin oksidatif burst kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hastalar şu şekilde gruplara ayrılmıştır: Anti-HBe (+) grup: HBsAg (+), anti-HBe (+) ve anti-HBc IgG (+) olan 20 kişi, HBeAg (+) grup: HBsAg (+), HBeAg (+) ve anti-HBcIgG (+) olan 10 kişi, Kontrol grubu: HBsAg (-), anti-HBs (+), anti-HBc IgG (+) olan doğal bağışık, yaş ve cinsiyet uyumlu 30 kişi. Serumda IgG, IgA, IgM, ve IgG subgrupları (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) düzeyleri araştırılmış, flositometrik yöntemle nötrofillerin oksidatif kapasitesini ölçen nötrofil burst test yapılmıştır. Serum Ig (IgG, IgA, IgM) düzeyleri üç grup arasında anlamlı bir farklılık göstermiyordu (p>0.05). IgG₁, IgG₂, IgG₃ ve IgG₄ karşılaştırıldığında, anti-HBe (+) grup ile HBeAg (+) grup arasında ilişki anlamsızdı; fakat bu iki grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anti-HBe (+) grupta IgG₁ ve IgG₂ düzeylerinin, HBeAg (+) grupta ise IgG₂ düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. HBeAg (+) grupta, anti-HBe (+) ve kontrol grubuna göre nötrofil burst test değerleri anlamlı olarak düşük saptandı. Sonuç olarak, kronik HBV gelişimi ve ilerlemesinde immünolojik değişiklikler önemlidir. Nötrofil fonksiyonları üzerinde yapılacak daha ileri araştırmalar hastalığın seyrinin daha iyi anlaşılmasının ve yeni tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

SUMMARY

Hepatitis B Virus (HBV) is suggested to show its effects via immunological alterations, not by direct cytopathic damage. Patients who fail to mount a vigorous immune response in acute HBV develop chronic infection. The aim of this study was to determine serum immunoglobulin levels and oxidative burst capacity of neutrophils in patients with chronic hepatitis B carriers. The study groups were composed as follows: Anti-Hbe (+) group: 20 patients with HBsAg (+), anti-HBe (+) and anti-HBc IgG (+); HBeAg (+) group: 10 patients with HbsAg (+), HbeAg (+) and anti-HbcIgG (+). The control group was composed of age and sex-matched 30 healthy people naturally immunized against HBV who were negative for HBsAg and positive for anti-HBs and anti-HBc IgG. Sera of the study group were investigated for IgG, IgA, IgM, and IgG subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄). Oxidative capacity of neutrophils were investigated by flowcytometric neutrophil burst test. Serum immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) levels were not significantly different between three groups (p>0.05). When IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄ levels were compared, the relation between anti-HBe (+) and HBeAg (+) patients were insignificant, but when these two groups were compared with the control group, anti-Hbe (+) patients had significantly higher IgG₁ and IgG₂ levels while HBeAg (+) patients had only significantly higher IgG₂ levels. Flowcytometric neutrophil burst test values were significantly lower in HBeAg (+) patients when compared with anti-HBe (+) patients and the control group. Immunological responses are important in the development and progression of chronic hepatitis B infection. Further investigations on neutrophil functions may lead to new treatment modalities and may be useful to understand the survey of the disease.

GİRİŞ

Hepatit B Virüs (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada görülen, önemli mortalite ve morbiditeye neden olan endemik bir hastalıktır. Dünya nüfusunun %5'i, yaklaşık 350-400 milyon kişi HBV ile enfektedir. Bunların %75'i Asya'da yaşamaktadır (1-3). Hepatit B Virus enfeksiyonu geçiren erişkin hastaların yaklaşık %10'unda HBsAg kaybolmayarak kişiyi HBV taşıyıcısı haline getirir. Bu durumda hastalar re-aktivasyon, süperenfeksiyon, kronikleşme ve primer karaciğer karsinomu gelişimi riski altındadırlar (4-6). Konakla ilişkili faktörler özellikle yaş ve immunité kronik HBV enfeksiyonu gelişiminde önemlidir. Virusun etkilerini direkt sitopatik hasardan çok immunolojik değişikliklere yol açarak gösterdiği düşünülmektedir (1, 5, 7). T ve B lenfositleri yanı sıra nötrofil lökositlerin de immun yanıtta rol oynadıkları bilinmektedir. Kemotaksis, fagositoz ve süperoksit salınımı gibi nötrofil fonksiyonları immun yanıt için gereklidir (8). Nötrofiller mikro-organizmaların dokulara invazyonunu önlemede ilk savunma hücreleridir (9). Fagositoz sonrasında yüksek oranda süperoksit ve hidrojen peroksit oluşur. Oksijen kullanımındaki bu belirgin artış respiratuvar burst olarak adlandırılır. Bu durumda enerji üretiminden çok, güçlü mikrobisidal ajanların üretilmesi söz konusudur (10-11). Respiratuvar burst ilk kez 1933 yılında keşfedilmiştir, fakat bundan sonraki çeyrek asırda bu konu üzerinde pek çalışma yapılmamıştır. 1960'dan sonra mikrobisidal etkisi fark edilince tüm dünyada respiratuvar burst ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (10). Kronik granulomatöz hastalık respiratuvar burst bozukluklarının prototipidir. Bu hastalıkta nötrofillerin fagositoz fonksiyonu normal olmasına rağmen fagosite edilen mikro-organizmalar öldürülemez ve çocuklarda ölümle sonuçlanan lokal apseler meydana gelir. Son çalışmalarda yetersiz sıvısal immun yanıtta nötrofil oksidasyon mekanizmalarındaki değişiklikler üzerinde durulmakta ve HBV enfeksiyonunun lökositlerin enfeksiyonu için bir rezervuar görevi gördüğü ve virion transmisyonunda rol oynadığı öne sürülmektedir (12).

Bu çalışmada, kronik HBV taşıyıcılarında serum Ig düzeylerinin (IgG, IgA, IgM ve IgG subgrupları) ve nötrofillerin oksidatif burst kapasitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji-ELISA Laboratuvarı'nda Ocak-Aralık 2000 tarihleri arasındaki dönemde aşağıdaki hasta gruplarına ait serumlar incelenmiştir.

Anti-HBe (+) grup: HBsAg (+), anti-HBe (+) ve anti-HBc IgG (+) olan 20 kişi, HBeAg (+) grup: HBsAg (+), HBeAg (+) ve anti-HBcIgG (+) olan 10 kişi, Kontrol grubu: HBsAg (-), anti-HBs(+), anti-HBc IgG (+) olan doğal bağışık, yaş ve cinsiyet uyumlu 30 kişi.

Çalışma gruplarında IgG, IgA, IgM, ve IgG subgruplarının (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) serum düzeyleri ölçüldü. IgG, IgA, IgM turbidimetrik metod (EQUIPAR S.R.L Saronno VA) ile IgG subgrupları (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) nefolometrik metod (NAS 1-4, Dade Behring, Almanya) ile çalışılmıştır. Heparinize taze kan örnekleri alınarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik İmmünoloji Laboratuvarı'nda flovisitometrik metod (Orpegen Pharma, Heidelberg, Almanya) ile opsonize *Escherichia coli* kullanılmak suretiyle nötrofil burst test yapılmıştır.

İstatistiksel analiz SPSS 11.0 paket programında Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışma grubunun demografik özellikleri Tablo 1'de, serum transaminaz değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet farkı bulunmamaktadır (p>0.05). Hepatit B Virus-DNA hepatitli hastalardan HBeAg (+) olan iki hastada, anti-HBe (+) olan hastalardan ikisinde olmak üzere toplam dört kişide pozitif bulunmuştur. Serum IgG, IgA, IgM, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ ve nötrofil burst test değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Serum immunglobulin (IgG, IgA, IgM) düzeyleri karşılaştırıldığında üç grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05). IgG₁, IgG₂, IgG₃ ve IgG₄ düzeyleri karşılaştırıldığında anti-HBe (+) ve HBeAg (+) hastalar arasındaki ilişki anlamsız iken, bu iki grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anti-HBe (+) grupta IgG₁ ve IgG₂ düzeylerinin, HBeAg (+) grupta ise sadece IgG₂ düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,001, p=0.000). Nötrofil burst test değerleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında HBeAg (+) hastaların değerleri, anti-HBe (+) hastalar ve kontrol grubunun değerlerinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p=0.001).

Tablo 1. Hasta grupları ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet özellikleri

Çalışma grupları	Cinsiyet*		Yaş* (mean±Sd)
	Erkek n (%)	Kadın n (%)	
HBeAg + (n=10)	7 (70)	3 (30)	31.3 ±14.2
Anti-HBe + (n=20)	13 (65)	7 (35)	39.0±14.9
Kontrol grubu (n=30)	19 (63.3)	11 (36.7)	38.1 ±10.5

* p>0.05

Tablo 2. Serum ALT ve AST düzeyleri

	Çalışma grupları	Sayı	Mean±Sd.	p*
ALT (U/L)	Anti-HBe (+)	20	33.5 ±31.4	0.030
	HbeAg (+)	10	15.9 ±14.3	
	Control	30	30.1 ±57.9	
AST (U/L)	Anti-HBe (+)	20	45.2 ±57.7	0.708
	HbeAg (+)	10	28.4 ±28.5	
	Control	30	40.0 ±62.8	

* Kruskal-Wallis varyans analizi

Tablo 3. Serum IgG, IgA, IgM, IgG alttıpleri ve neutrophil burst test düzeyleri

	Çalışma grupları	Sayı	Mean±Sd.	p*
IgG (mg/dl)	Anti-HBe (+)	20	1871.7 ±320.4	0.322
	HBeAg (+)	10	1798.7 ±444.1	
	Kontrol	30	2124.1 ±768.7	
IgA (mg/dl)	Anti-HBe (+)	20	424.2 ±145.6	0.087
	HBeAg (+)	10	294.0 ±136.4	
	Kontrol	30	395.8 ±143.1	
IgM (mg/dl)	Anti-HBe (+)	20	208.3 ±100.4	0.299
	HbeAg (+)	10	200.1 ±106.9	
	Kontrol	30	289.1 ±193.7	
IgG ₁ (g/l)	Anti-HBe (+)	20	9.77±3.15	0.001
	HBeAg (+)	10	9.69±3.71	
	Kontrol	30	7.52±3.0	
IgG ₂ (g/l)	Anti-HBe (+)	20	3.47±1.61	0.000
	HBeAg (+)	10	3.29±.71	
	Kontrol	30	2.14±.95	
IgG ₃ (g/l)	Anti-HBe (+)	20	0.55±0.31	0.259
	HBeAg (+)	10	0.60±0.44	
	Kontrol	30	0.41±0.19	
IgG ₄ (g/l)	Anti-HBe (+)	20	0.44±0.29	0.092
	HBeAg (+)	10	0.54±0.43	
	Kontrol	30	0.32±0.22	
Flovisitometrik test (% pozitif)	Burst Anti-HBe (+)	20	84.50±10.64	0.001
	HBeAg (+)	7	59.00±15.52	
	Kontrol	30	91.53±17.57	

* Kruskal-Wallis varyans analizi

TARTIŞMA

Hepatit B Virus enfeksiyonunun seyrinde karaciğerde oluşan hasarda konağın çeşitli viral antijenlere karşı oluşturduğu spesifik ve non-spesifik immun yanıtı rol oynamaktadır (13). Akut HBV enfeksiyonu sırasında yeterli

immun yanıt oluşturamayan bireylerde kronik enfeksiyon gelişir (14). Hepatit B Virus enfeksiyonunda ilk oluşan antikorlar pre-S1 ve pre-S2 antijenlerine karşıdır. Pre-S1 antijenleri virüsün hepatositlere bağlandığı alanlar olduğu için bu antikorların erken oluşması ile enfeksiyon

kontrol altında tutulabilir. Hücrel immuniteye bakıldığında akut hepatitin ilk haftalarında doğal öldürücü hücrelerin aktivitelerinde artış vardır. Daha sonra kor epitoplara duyarlı CD4 (+) T lenfositleri gözlenmiştir (7). Kronik HBV enfeksiyonunda hücrel ve sıvısal immunitiyi inceleyen pek çok araştırma vardır. Vuitton and Trepo (15) kronik aktif hepatitte, karaciğer lezyonlarının gelişiminde hücrel immunitenin, karaciğer dışı lezyonların gelişmesinde ise immun komplekslerin rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Ünal ve ark. (14) CD8 (+) lenfositlerdeki artış yanı sıra, IgG düzeyinde artış, C4 düzeyinde azalma bildirmişlerdir (16). Bir başka çalışmada ise CD8 (+) hücrelerde azalma bildirilmiştir (16). Doğal serokonverzyonda anti-HBs, yüksek oranda nötralizan IgG₁ ve IgG₃'le sınırlıdır, IgG₂ ve IgG₄'ün katkısı azdır.

Gregorek ve ark. (17) interferon alfa tedavisi sonrası tam olarak serokonversiyon gösteren 19 kronik aktif hepatit B'li çocukta anti-HBs Ig G'nin alt gruplarının dağılımını araştırmışlar ve IgG subgrupları arasında farklılık saptamışlardır. Diğer yandan bir başka çalışmada hepatit membranlarında HBcAg'ye spesifik IgG₁ ve IgG₃ saptanmış (18), Chen ve ark. (19) bu membranların IgG₂ ve IgG₄ de içerdiğini, ancak IgG₃'ün daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada HBV'ye spesifik IgG supgrupları incelenmiştir. Hasta gruplarındaki total IgG₁, IgG₂, IgG₃ ve IgG₄ düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anti-HBe (+) grupta IgG₁ ve IgG₂ düzeylerinin,

HBeAg (+) grupta ise sadece IgG₂ düzeyinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kronik HBV enfeksiyonunda hastaların % 87.5'nin periferik kan mononükleer hücrelerinde en az bir HBV göstergesi içerdiği bulunmuştur (20). Çeşitli lökosit alt grupları incelendiğinde mononükleer hücreler yanı sıra polimorfonükleer lökositlerin de HBV-DNA içerdiği gösterilmiştir. Hepatit B Virus-DNA daha çok HBeAg (+) HBsAg taşıyıcılarında saptanmış olmasına rağmen (% 79), anti-HBe (+) olanların % 50'sinde serumda HBV-DNA pozitifliğinden bağımsız olarak lökositlerde HBV-DNA saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Davison ve ark. (21) lökositlerin enfeksiyon için bir rezervuar oluşturacağını ve viral transmisyonunda rol oynayacağını öne sürmüşlerdir. Pawlowska ve ark. (22) kronik aktif viral hepatitli hastaların periferik kan nötrofil fonksiyonlarını incelemişler ve uyarılmış nötrofil burst test değerlerinde azalma saptanmışlardır. Bir başka çalışmada, spontan ve uyarılmış nötrofil fonksiyonlarında kronik HBV'li hastalarda konvelesanlar karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmıştır (13). B çalışmada HBeAg (+) grupta uyarılmış nötrofil burst test değerlerinde anlamlı olarak azalma bulundu.

Kronik HBV enfeksiyonun gelişmesinde ve ilerlemesinde immünolojik yanıtlar önemlidir. Nötrofil fonksiyonları üzerinde yapılacak daha ileri araştırmalar hastalığın seyrini daha iyi anlamada ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Shaw-Stiffel TA. Chronic hepatitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 1297-331.
2. Ray G, Ghoshal UC, Banerjee PK, et al. Aetiological spectrum of chronic liver disease in eastern India. *Trop Gastroenterol* 2000; 21: 60-2.
3. Bilir N. Sağlık çalışanlarının önemli bir mesleki riski. *Surekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1996; 5: 10-2.
4. Canoruc F. Viral hepatitler. Telatar H, Şimşek H, ed. *Gastroenteroloji* Ankara: Medikommat Basım Yayın, 1993: 683-747.
5. Koff RS. Diagnosis of viral hepatitis. In: Surawicz C, Owen RL, eds. *Gastrointestinal and Hepatic Infections* Philadelphia: WB Saunders Co, 1995: 297-312.
6. Koff RS. Hepatitis B and Hepatitis D. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious Diseases*. WB Saunders Co, 1998; 850-64.
7. Batur Y, Bor S. Kronik viral hepatitlerin patogenezi ve epidemiyolojisi. Acar A, Bor S, ed. *Gastroenteroloji'den Seçmeler*. İstanbul: Adak Matbaacılık, 1995: 88-113.
8. D'Odorico A, Melis A, Baragiotta A, Martines D, Naccarato R, Floreani A. Oxygen-derived free radical production by peripheral blood neutrophils in chronic cholestatic liver diseases. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1831-5.
9. Grunwald MH, Shriker O, Halevy S, et al. Impaired neutrophil functions in patients with leukocytoclastic vasculitis. *Int J Dermatol* 1997; 36: 509-13.
10. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73: 599-601.
11. Levy R, Rotrosen D, Nagauker O, et al. Induction of the respiratory burst in HL-60 cells. *J Immunol* 1990; 145: 2595-601.
12. McCord JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Int Med* 1978; 89: 122-7.
13. Sulowska Z, Pietruszynski R, Dworniak D, Tchorzewski H, Sidorkiewicz M. Oxidative burst response of neutrophils primed with PreS1 antigen of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B and convalescents. *J Viral Hepat* 1996; 3: 293-9.

14. **Unal F, Genel F, Ozgenc F, et al.** Immune status and autoantibody formation in children with chronic hepatitis B infection. *Panminerva Med* **2002**; 44: 353-7.
15. **Vuitton D, Trepo C.** Immunopathologic mechanisms responsible for hepatic lesions caused by virus. *Pathol Biol* **1984**; **32**: 190-8.
16. **Saltoglu N, Cetiner S, Tasova Y ve ark.** Hepatit B Virus ile bazı immun parametrelerin iliskisinin degerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg* **1996**; 2: 73-9.
17. **Gregorek H, Madalinski K, Woynarowski M, Mikolajewicz J, Syczewska M, Socha J.** IgG subclass distrubution of hepatitis B surface antigen antibodies induced in children with chronic hepatitis B infection after interferon-alpha therapy. *J Infect Dis* **2000**; 181: 2059-62.
18. **Trevisan A, Realdi G, Alberti A, Ongaro G, Pornaro E, Meliconi R.** Core antigen-specific immunoglobulin G bound to the liver cell membrane in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **1982**; 82: 218-22.
19. **Chen G, Karayiannes P, McGarvey MJ, et al.** Subclasses of antibodies to hepatitis B core antigen in chronic HBV infection: changes during treatment with alpha interferons and predictors of response. *Gut* **1989**; 30: 1123-8.
20. **Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C.** Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol* **1990**; 31: 312-7.
21. **Davison F, Alexander GJ, Anastassakos C, Fagan EA, Williams R.** Leucocyte hepatitis B virus DNA in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* **1987**; 22: 379-85.
22. **Pawlowska E, Ciecko-Michalska I, Bogdal J, Turowski G.** Metabolic activity of neutrophils in patients suffering from chronic viral hepatitis. *Med Sci Monit* **2000**; 6: 1136-41.

İLETİŞİM

Uz. Dr. Turan GÜNDÜZ
Uncubozköy Mah.
Tunenç Sok. No: 25/5
45040 MANİSA
e-posta: drtgunduz@yahoo.com