

HBeAg POZİTİF KRONİK HEPATİT B OLGULARINDA SERUM MALONDİYALDEHİT DÜZEYİNİN KARACİĞER HİSTOPATOLOJİSİ VE İNTERFERON TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ

RELATIONSHIP OF SERUM MALONDIALDEHYDE LEVELS WITH LIVER HISTOPATHOLOGY AND INTERFERON TREATMENT IN HBeAg POSITIVE CHRONIC HEPATITIS B CASES

Nermin KILIÇ¹

Ahmet KALKAN²

Mehmet ÖZDEN³

Affan DENK²

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ

¹Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

²İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

³İmmünoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: Malondiyaldehit, nekro-inflamasyon, fibrozis, hepatit B virüsü (HBV), HBV-DNA, interferon

Keywords: Malondialdehyde, necroinflammation, fibrosis, hepatitis B virus (HBV), HBV-DNA, interferon

Geliş: 09 Mart 2004

Kabul: 25 Ekim 2004

ÖZET

Bu çalışmada; kronik hepatit B'li olgularda serum malondiyaldehit (MDA) düzeyinin, MDA düzeyi ile viral yük, karaciğerin nekro-inflamasyonu ve fibrozis arasındaki olası ilişkinin ve interferon tedavisi gören olgularda MDA düzeyinin nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 44 kronik hepatit B olgusu ile 44 sağlıklı gönüllü alındı. Klinikte tedavi uygulanabilen 15 olgu tedavi sonunda yeniden değerlendirildi. Çalışma grubunda viral etyolojiye yönelik serolojik göstergeler ile birlikte alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri; serum MDA ve hepatit B virüs-DNA (HBV-DNA) düzeyleri araştırıldı. Karaciğer histopatolojik bulguları modifiye Knodell skorlamasına göre nekro-inflamatuvar aktivite (grade) ve fibrozis (stage) olarak skorlandı. Kronik hepatit B grubunun MDA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). Kronik hepatit B olgularının MDA düzeyleri ile viral yük, karaciğerin nekro-inflamasyonu ve fibrozis arasında korelasyon saptanmadı (sırasıyla $r=0.031$; -0.144 ve -0.009 ; $p>0.05$). Tedavi edilen kronik hepatit B olgularında tedavi sonrası ortalama MDA düzeyleri, tedavi öncesi MDA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.05$). Sonuç olarak, bulgular kronik hepatit B'de oksidatif stresin varlığını ve interferon tedavisinin karaciğerdeki oksidatif stresi inhibe ettiğini desteklemektedir.

SUMMARY

The purpose of the present study was to investigate the relation of serum malondialdehyde (MDA) levels, MDA and viral burden to necroinflammation of liver and fibrosis and effects of interferon therapy on MDA in patients with chronic hepatitis B. Forty-four chronic hepatitis B patients and 44 healthy volunteers were enrolled in the study. Fifteen cases who could be treated at the authors' clinic were re-evaluated at the end of the therapy. At the end of the study, together with the serological markers relating to viral aetiology, alanin aminotransferase (ALT), aspartat aminotransferase (AST), serum MDA and hepatitis B virus-DNA (HBV-DNA) levels were determined in the study group. Histopathological findings in the liver were scored as necroinflammatory activity (grade) and fibrosis (stage) according to the Knodell scoring scale. The malondialdehyde levels were significantly higher in the chronic hepatitis B patients compared to the healthy controls ($p<0.05$). No significant correlation could be found between MDA levels and viral burden, necroinflammation and fibrosis of the liver in the chronic hepatitis B patients ($r=0.031$; -0.144 and -0.009 , respectively, $p>0.05$). However, post-treatment MDA levels were found to be significantly lower than the pre-treatment values in the patients ($p<0.05$). In conclusion, the present findings appear to confirm the presence of oxidative stress in chronic hepatitis B and interferon therapy inhibits this oxidative stress in the liver.

GİRİŞ

Hepatiti B virüs infeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülen ve yüksek oranda kronikleşebilen bir infeksiyondur. İnfeksiyon yenidoğan döneminde %80-90 oranında kronikleşirken, altı yaştan küçük çocuklarda %30, erişkinlerde ise yaklaşık %1-5 oranında kronikleşir (1). Hepatit B virüs (HBV) infeksiyonunun patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Hepatit B virüs spesifik sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) hepatosit hasarı ve viral klirenste önemli rol oynadığına inanılmaktadır (2, 3). Hepatit B virüs e antijeni (HBeAg) hücrel immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan immün dominant epitoplara içerir (4). Virüse karşı zayıf immün yanıtın geliştiği konakta viral persistans gelişir. Hepatit B virüsüne karşı konak immün yanıtı yalnızca virüsün klirensini sağlamaz, aynı zamanda klinik ve histopatolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına da neden olur (2, 5).

Kronik hepatit B infeksiyonunda, uzun süren inflamatuvar reaksiyon sonucu artan kollajen sentezi ile birlikte karaciğer sirozu ve yetmezliğine kadar giden bir süreç gelişir (6). Oksidatif stresin patogeneze rol oynayabileceği, karaciğerin hasarlanmasında kollajen sentezini regüle ederek bu sürece katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (7). Hepatit B virüsünün, fagositik hücreleri aktive ederek reaktif oksijen türlerinin ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi pro-oksidan sitokinlerin salınmasına, konakçı hücrede pro-oksidan ve anti-oksidan dengesini etkileyerek süperoksit dismutaz (SOD) gibi anti-oksidan enzimlerin inhibisyonuna neden olabileceği saptanmıştır (8). Serbest radikallerin hücre membranının önemli bir bileşeni olan poli-ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olup enzim ve proteinlerle reaksiyona girerek hücre zarı fonksiyonlarının kaybolmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonunun hepatosit zedelenmesi nedenlerinden biri olduğu ve MDA'nın kollajen gen ekspresyonunu ve üretimini artırdığı bildirilmektedir (9).

Bu çalışmada; kronik hepatit B'li olgularda serum MDA düzeyinin, MDA düzeyi ile viral yük, karaciğerin nekro-inflamasyonu ve fibrozis arasındaki olası ilişkinin ve interferon tedavisi alan olgularda MDA düzeyinin nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kronik hepatit B olguları: Bu çalışma, Ocak 2000 ile Aralık 2003 tarihleri arasında prospektif bir çalışma olarak yürütülmüştür. Kronik hepatit B tanısı konulan toplam

44 hasta [37 erkek, 7 kadın; yaş aralığı 16-57 (31.43±10.58)] çalışma kapsamına alındı. Yazarların kliniğinde izlenen ve altı aydan uzun süre HbsAg pozitifliği olan olgularda kronik hepatit B tanısı histopatolojik olarak konuldu. Çalışmaya alınan olguların tümü; HBsAg pozitif anti-HBs negatif, HBeAg pozitif, anti-HBe negatif, anti-HBc IgM negatif, anti-HBc total pozitif, HBV-DNA>2.5 pg/ml ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ≥ 40 IU/L olan olgulardan oluşturuldu. Çalışma kapsamına alınacak olgular için, HBV infeksiyonu dışında kronik karaciğer hastalığına neden olabilecek etyolojileri dışlamak amacıyla infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan nedenler araştırıldı. İnfeksiyöz etyoloji için anti-hepatit C virüs (anti-HCV), anti-hepatit D virüs (anti-HDV)'nin negatif olması, çalışmaya alınma kriteri olarak belirlendi. Çalışmaya alınan olgular içerisinde klinikte tedavi uygulanabilen (bir yıl süreyle IFN alfa-2a veya IFN alfa-2b ve lamivudine kombinasyonu) 15 olgu tedavi sonunda yeniden değerlendirildi.

Kontrol grubu: HBV infeksiyonu veya kronik karaciğer hastalığına neden olabilecek etyolojik bir neden saptanamayan toplam 44 sağlıklı gönüllü kişiden [35 erkek, 9 kadın; yaş aralığı 17-59 (32.45±10.05)] oluşturuldu. Kronik karaciğer hastalığına neden olabilecek infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan etyolojileri dışlamak amacıyla çalışma grubuna uygulanan işlemlerin tümü kontrol grubu için de uygulandı.

Kronik hepatit B ve kontrol grubunda ayrıca, fizyolojik koşullarda var olan oksidatif stres ve anti-oksidan sistem arasındaki dengeyi bozabilecek faktörlerin varlığı araştırıldı. Bu amaçla, antioksidan tedavi (E vitamini, C vitamini v.b.) alanlar, karaciğer dışı kronik hastalığı olanlar (KOA, diyabet v.b.), alkol kullanan ve serbest radikalleri etkileyebilecek herhangi bir ilaç kullananlar (beta bloker v.b.) çalışma kapsamı dışında tutuldu. Sigara kullanımı yönünden seçim yapılmadı. Kontrol grubu seçiminde sigara içenlerin oranının hasta grubuna benzer olmasına dikkat edildi.

Kronik hepatit B ve kontrol grubunda viral etyolojiye yönelik serolojik göstergeler ile birlikte, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri; serum MDA düzeyi araştırıldı. Kronik hepatit B grubunda kantitatif HBV-DNA ölçümü yapıldı. Ayrıca, tedavi edilen olguların tedavi sonunda serum MDA, ALT, AST ve viral yük değerleri araştırıldı. Serolojik markerler, ALT, AST ve HBV-DNA için normal tüpe alınan venöz kan santrifüj edilerek (3000 devir/dk'da 5 dk) serumu ayrıldı ve çalışılincaya kadar -20° C'de derin dondurucuda saklandı.

Viral serolojik göstergeler, serum HBV-DNA düzeyleri ile serum ALT ve AST düzeylerinin saptanması:

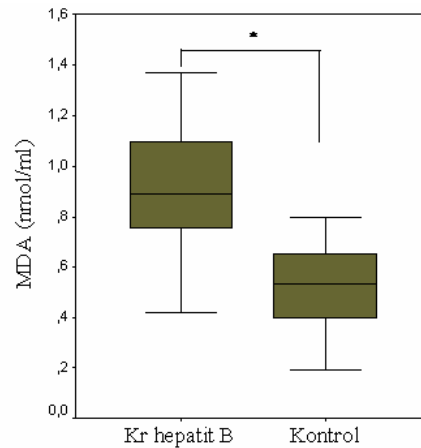
Hepatit B virüs serolojik göstergeleri (HbsAg, anti-HbsAg, HbeAg, anti-HbeAg, anti-Hbc IgM/G), anti-HCV ve anti-Delta mikro ELISA ile araştırıldı. Bu amaçla ticari kitler (Dia-Sorin, Vercelly, İtalya) kullanıldı. Serum örnekleri üretici firma önerilerine göre Tecan Genesis RMP 100/4 (Zurich, İsviçre) cihazında incelendi. Serum HBV-DNA düzeyleri kantitatif olarak bDNA yöntemi ile ölçüldü ve sonuçlar pg/ml [üretici firma önerisine göre eşik değer 2.5 pg/ml (1 Meq/ml=3.53pg/ml)] olarak kaydedildi. Serum ALT ve AST düzeyleri Olympus AU 600 oto-analizörde (Olympus Corp, Japonya) ölçüldü.

Histopatolojik değerlendirme ve serum MDA düzeyinin saptanması: İnce iğne biyopsisi ile alınan karaciğer dokusu örneklerinin histopatolojik değerlendirmesi Patoloji Laboratuvarı'nda yapıldı ve modifiye Knodell skorlamasına göre nekro-inflamatuvar aktivite (grade) ve fibrozis (stage) olarak skorlandı (10). Malondiyaldehit tayini, Satoh ve Yagi'den modifiye edilen bir yöntemle (11, 12) 95°C'de MDA'nın pH'ı 3.4 olan bir ortamda tiyobarbitrik asit ile inkübasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de (Schmadzu UV-12001V, Japonya) marka spektrofotometresinde ölçümüyle yapıldı. Serum örneklerinde ölçülen MDA değeri, nmol/ml olarak belirtildi.

İstatistiksel değerlendirme: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde; Statistical Package for Social Sciences version 10.01 (SPSS) bilgisayar programı kullanıldı. Kronik hepatit B ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında student's t testi; tedavi öncesi ile tedavi sonu MDA düzeylerinin karşılaştırılmasında ise paired T testi kullanıldı. Serum MDA düzeyi ile viral yük ve nekro-inflamatuvar aktivite ve fibrozis arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Pearson korelasyon analizi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Kronik hepatit B olguları ve kontrol grubunun ortalama serum ALT, AST, HBV-DNA ve MDA değerleri ile ortalama fibrozis ve nekro-inflamatuvar aktivite değerleri Tablo 1'de sunulmuştur. Kronik hepatit B olgularının serum ortalama MDA düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 1). Kronik hepatit B olgularının MDA düzeyleri ile viral yük, karaciğerin nekro-inflamasyonu ve fibrozis arasında korelasyon saptanmadı (sırasıyla $r = 0.031$; -0.144 ve -0.009 ; $p > 0.05$).



Şekil 1. Kronik hepatit B ve kontrol grubunun ortalama malondiyaldehit (MDA) düzeyleri (* $p < 0.05$)

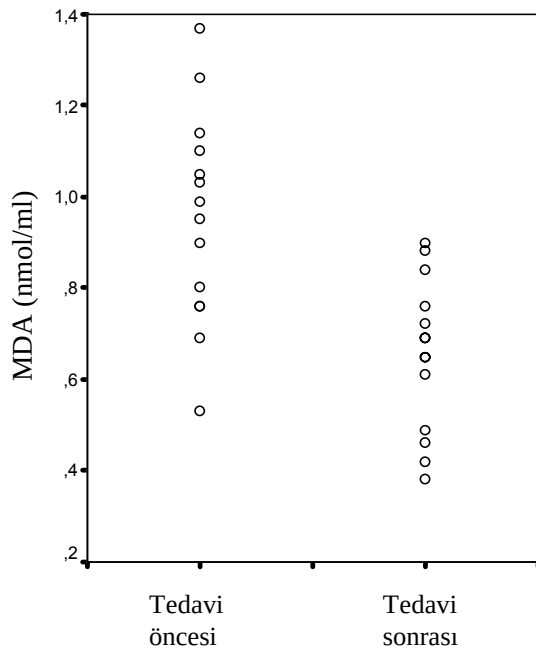
Tedavi edilen kronik hepatit B olgularında tedavi sonrası ortalama MDA düzeyleri, tedavi öncesi MDA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 2). Benzer şekilde tedavi sonrası serum ortalama ALT ve AST düzeyleri ile viral yük, tedavi öncesi serum ortalama değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p < 0.05$) (Tablo 2). Ancak üç olguda tedavi sonunda karaciğer enzimleri ve HBV-DNA düzeylerinin normal sınırların üzerinde kaldığı gözlemlendi.

Tablo 1. Kronik hepatit B'li olgularda ortalama ALT, AST, HBV-DNA ve MDA değerleri ile ortalama fibrozis ve nekro-inflamatuvar aktivite değerleri

Gruplar	Yaş (Yıl)	Cins. E/K	MDA (nmol/ml)	Viral yük (pg/ml)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Fibrozis (stage)	Nekro-inflamatuvar aktivite(Grade)
Kronik hepatit B (n=44)	31.43±10.58	37/7	0.92±0.22*	3924.6±817.07	138.9±17.3	75.06±0.6	1.84±0.18	6.27±0.51
Kontrol (n=44)	32.45±10.05	35/9	0.52±0.15	negatif	23.41±7.13	37.62±5.34	-	-

ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, HBV-DNA: Hepatit B virüs DNA, MDA: Malondiyaldehit

* $p < 0.05$



Şekil 2. Kronik hepatit B olgularında tedavi öncesi ve tedavi sonrası ortalama serum malondiyaldehit (MDA) düzeylerinin dağılımı

Tablo 2. Kronik hepatit B olgularında tedavi öncesi ve tedavi sonrası ortalama MDA düzeyleri ile serum ALT, AST, HBV-DNA düzeyleri

Gruplar	MDA (nmol/ml)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Viral yük (pg/ml)
Tedavi öncesi (n=15)	0.94±0.22*	127±20.9*	67±12.39*	5959.2±1507.8*
Tedavi sonrası (n=15)	0.64±0.16	55.3±7.2	38.6±3.8	473.6±353.6

ALT: Alanin amino transferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, HBV-DNA: Hepatit B virüs DNA, MDA: Malondiyaldehit

* p<0.05

TARTIŞMA

Çalışmada, kronik hepatit B'li olguların serum MDA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p<0.05$). Kronik hepatit B ve C gibi viral etiyojolojiye ya da alkolik siroz ve nonalkolik hepatosteatoz gibi virüs dışı nedenlere bağlı karaciğer hasarlanmasında serum ve karaciğer dokusunda lipit peroksidasyon ürünü MDA düzeyinin arttığı bildirilmektedir (13). Kronik hepatit B'li olguların serum MDA düze-

yinin kontrol grubuna göre yüksek oluşu literatürle uyumludur. Malondiyaldehit yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla birlikte, lipit peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir (14). Malondiyaldehit düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek oluşu, kronik hepatit B'li olgularda oksidatif stresin varlığını ve buna bağlı olarak hepatosellüler lipitlerin peroksidasyona uğradığını düşündürmektedir.

Lipit peroksidasyonunun hepatosit zedelenmesi nedenlerinden biri olduğu, aldehidik ürünlerinden olan MDA'nın kollegen gen ekspresyonunu ve üretimini artırdığı bildirilmektedir (9). Ayrıca, hücreler ve organellerin membranlarında oluşan lipit peroksidasyonu endoplazmik retikulum, mitokondri ve diğer mikrozomal komponentlere zarar verdiği rapor edilmiştir (15). Çalışmada, kronik hepatit B'li olgularımızın serum MDA düzeyleri ile karaciğerin nekro-inflamasyon ve fibrozisi arasında korelasyon saptanmamıştır. Lipit peroksidasyon derecesiyle iyi korelasyon gösterdiği bilinen MDA ile nekro-inflamasyon ve fibrozis arasında korelasyon olmasa da MDA'nın kontrol grubuna göre yüksek oluşu karaciğer hasarına oksidatif stresin katkısının olduğunu düşündürmektedir.

Hepatit B virus enfeksiyonu bazı immünolojik göstergelerin belirlediği birbirini izleyen dört evrede gelişir. HBsAg (+), anti-HBs (-), HBV-DNA (+), HbeAg (+), anti-HBe (-), anti-HBc (+), ALT ve AST düzeylerinin yükselmiş olduğu evre enfeksiyonun ikinci evresidir. Enfeksiyonun ikinci evresi immün sistemin aktive olduğu, nekro-inflamatuvar hasarın geliştiği evre olup kronik hastalarda yıllarca sürebilir (16). Enfeksiyonun ikinci evresindeki kronik hepatit B olguları olarak değerlendirebilecek olgularda, serum MDA düzeyindeki artışın immün aktivasyon ile ilişkili oksidatif strese bağlı olabileceği düşünülebilir. Tedavi edilen olgularda tedavi sonrası ortalama MDA düzeyleri, tedavi öncesi MDA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. Diğer yandan, tedavi sonrası serum ortalama ALT ve AST düzeyleri ile viral yükün de tedavi öncesi serum ortalama değerlerine göre anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı. Bu bulgular, Serejo ve ark. (17)'nin kronik hepatit C'de bildirdikleri gibi, kronik hepatit B'de de interferon alfa tedavisinin karaciğerdeki oksidatif stresin inhibisyonuna katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bulgular kronik hepatit B'de oksidatif stresin varlığını ve interferon tedavisinin karaciğerdeki oksidatif stresi inhibe ettiğini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. **Juszczyk J.** Clinical course and consequences of hepatitis B infection. *Vaccine* **2000**; 18: 23-5.
2. **Chisari FV, Ferrari C.** Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* **1995**; 13: 29-60.
3. **Rehermann B, Chisari FV.** Cell mediated immune response to the hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **2000**; 242: 299-325.
4. **Ferrari C, Bertoletti A, Penna A, et al.** Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* **1991**; 88: 214-22.
5. **Hilleman MR.** Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeusis of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications. *Vaccine* **2001**; 19: 1837-48.
6. **Robinson WS.** Hepatitis B virus and hepatitis D virus. *In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2000**:1736-60.
7. **Pietrangelo A.** Metals, oxidative stres, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* **1996**; 16: 13-30.
8. **Schwarz KB.** Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* **1996**; 21: 641-9.
9. **Britton RS, Bacon BR.** Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* **1994**; 41: 343-8.
10. **Knodel RG, Ishak KG, Black WC, et al.** Formulation and application of a numerical scoring system for accessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* **1981**; 1: 431-5.
11. **Satoh K.** Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* **1978**; 90: 37-43.
12. **Yagi K.** Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* **1984**; 105: 328-31.
13. **Boya P, de la Pena A, Beloqui O, et al.** Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* **1999**; 31: 808-14.
14. **Akkuş İ.** *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri.* Konya: Mimoza Yayınları, **1995**: 1-47.
15. **Cortan RS, Kumar V, Robbins SL.** *Robbins Pathologic Basis of Diseases.* 4th ed. Philidelphia: WB Saunders Co, **1989**: 1-38.
16. **Kılıçturgay K.** Viral hepatitte immünopatogeneze. Tekeli E, Balık İ, ed. *Viral Hepatit 2003'te.* Ankara: Karakter Color AŞ, **2003**: 316-28.
17. **Serejo F, Emerit I, Filipe PM, et al.** Oxidative stress in chronic hepatitis C: the effect of interferon therapy and correlation with pathological features. *Can J Gastroenterol* **2003**; 17: 644-50.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Ahmet KALKAN
 Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
 Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 23119 ELAZIĞ
 e-posta: akalkan61@hotmail.com