

FULMİNAN VE NON-FULMİNAN SEYİRLİ AKUT VİRAL HEPATİT OLGULARINDA SERUM TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR-ALFA (TNF- α), İNTERLÖKİN-1BETA (IL-1 β) VE İNTERLÖKİN-1 RESEPTÖR ANTAGONİST (IL-1Ra) DÜZEYLERİ

Halis AKALIN, Güher GÖRAL, Safiye HELVACI, Reşit MISTIK, Cezmi AKDIŞ,
Kaya KILIÇTURGAY

ÖZET

Altı fulminan seyirli akut viral hepatit (FH) ve 23 akut viral hepatit (AVH) olgusunda serum TNF- α , IL-1 β ve IL-1Ra düzeyleri ölçüldü. TNF- α düzeyleri akut viral hepatitlerle karşılaştırıldığında fulminan hepatit (FH) olgularında anlamlı olarak yüksek bulundu. Akut viral hepatit, fulminan hepatit ve sağlıklı kontroller arasında serum IL-1 β ve IL-1Ra düzeyleri arasındaki farklar anlamlı bulunmadı. Hepatit patogenezinde rol oynayan sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) sitotoksik etkilerinin genellikle apoptozis yolu ile olduğu kabul edilmektedir. Hepatosit yüzeyinde bulunan Fas ve CTL yüzeyindeki FasL arasındaki ilişki ve TNF- α 'nın FasL ile yüksek düzeyde aminoasit benzerliğinden dolayı fulminan hepatitlerin bir kısmında yüksek TNF- α düzeylerinin endüklediği bir apoptozisin söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hepatit, sitokin.

SUMMARY

SERUM LEVELS OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALFA (TNF- α), INTERLEUKIN-1BETA (IL-1 β) AND INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST (IL-1Ra) IN PATIENTS WITH ACUTE VIRAL HEPATITIS (AVH) AND FULMINANT HEPATITIS (FH)

Serum levels of tumor necrosis factor-alfa (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in 23 patients with acute viral hepatitis (AVH) and in 6 patients with fulminant hepatitis (FH) were investigated. Levels of TNF- α were increased significantly in FH compared with AVH. There was no significant difference in IL-1 β and IL-1Ra levels between AVH, FH and control cases. Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) mediated hepatocyte injury and death are thought to occur via apoptosis. We think that in of fulminant hepatitis cases, apoptosis may be induced by high levels of TNF- α due to the interaction between Fas found on the hepatocytes and FasL expressed on the activated CTL since TNF- α has high aminoacid homology with FasL.

Key Words: Hepatitis, cytokine

Giriş

Karaciğer bazı sitokinler için önemli bir yapım ve atılım organıdır. Sitokinler sadece perifer ile karaciğer arasında iletişimi sağlamakla kalmazlar; aynı zamanda karaciğerin kendisi için de oldukça önemlidirler. Karaciğerde bulunan ve makrofajların önemli bir kısmını temsil eden Kupffer hücreleri, lipopolisakkarid, bakteri veya viruslarla uyarıldığında IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin üretiminde önemli rol oynamaktadırlar (1-3).

Hepatit çeşitli nedenlerle oluşan enflamatuvar bir karaciğer hastalığıdır.

Bu çalışmada, AVH ve FH'lerde TNF- α , IL-1 β gibi enflamatuvar sitokinlerin ve IL-1Ra gibi antagonistlerin serum düzeyle-

rini ölçtük ve klinik ve biyokimyasal parametrelerle ilişkisini araştırdık.

Gereç ve Yöntem

1993-1995 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'ne başvuran toplam 29 AVH'li hasta çalışmaya alındı.

6 hastaya (1 erkek, 5 bayan; 19-32 yaşları arasında) Trey ve Davidson (4) kriterlerine göre FH tanısı kondu. Başvuruda bun-

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Bursa

lardan 4'ü II. derece, 2'si ise III. veya IV. derecede hepatik ensefalopati tablosuna sahiptiler. 5 olguda etken HBV, diğer 1 hamile olguda ise HAV olarak bulundu.

23 hasta (13 erkek, 10 bayan; 15-62 yaşları arasında) ise AVH tanısı ile çalışmaya alındı. 14 olguda etken HAV, 9 olguda ise HBV olarak bulundu.

Ayrıca 14 sağlıklı erişkin (7 erkek, 7 bayan; 18-30 yaşları arasında) kontrol olarak çalışmaya alındı.

Serolojik olarak hepatit A tanısı anti-HAV IgM pozitifliği, hepatit B tanısı HBsAg ve anti-HBc IgM pozitifliğine dayanarak konuldu.

Sitokin ölçümleri için serum örnekleri hastanın yatışının ilk gününde alınır alınmaz -70°C'de donduruldu ve çalışmaya kadar bu şekilde saklandı.

TNF- α sandwich enzyme immunoassay ile (TNF- α EIA kit; Immunotech International, France); ve IL-1 β ve IL-1Ra Dr. Harry Towbin tarafından geliştirilen sandwich enzyme immunoassay ile ölçüldü (5).

Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi. En düşük saptama sınırı TNF- α için 15.6 pg/ml, IL-1 β ve IL-1Ra için 20 pg/ml olarak değerlendirildi. İstatistik hesaplamalarda bu sınırların altındaki saptanamayan değerler 0 olarak alındı.

Sonuçların istatistik hesaplamaları ANOVA test ile değerlendirildi. Sitokin düzeylerinin standart sapmaları oldukça farklı olduğu için önce logaritmik dönüşümler yapıldı ve daha sonra ANOVA test uygulandı. Sitokin düzeyleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde linear-regression analiz yöntemi kullanıldı.

Bulgular

AVH tanısı ile çalışmaya alınan tüm olgular komplikasyon olmaksızın iyileşerek taburcu edildiler.

FH tanısı ile çalışmaya alınan 6 olgudan 4'ü öldü. Etkenin HAV olduğu bir fulminan hamile olgu ile bir HBV fulminan olgu iyileştirildi.

AVH ve FH'li olguların biyokimyasal laboratuvar değerleri aşağıda sunulmuştur (Tablo 1). AVH ve FH'li olgular arasında ALT, AST ve bilirubin düzeyleri açısından anlamlı fark yoktu.

TABLO 1. Hepatitli Olgularda Serum ALT, AST, Bilirubin ve Protrombin Aktivitesi Düzeyleri (ort. \pm SD)

	AVH-B	AVH-A	FH
ALT (10-40 U/L)	1701 \pm 1529	1488 \pm 1704	3046 \pm 2050
AST (10-40 U/L)	1520 \pm 1240	1290 \pm 1688	2421 \pm 1731
Bilirubin (0.1-1 mg/dl)	8.1 \pm 4.1	6.3 \pm 2.6	11.3 \pm 6.3
Protrombin aktivi. (70-100%)	68 \pm 21	73 \pm 22	17 \pm 14

Protrombin düzeyleri FH'li olgularda anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$).

TNF- α ve AVH-B'li 9 olgunun 5'inde, AVH-A'lı 14 olgunun 10'unda ve FH'li 6 olgunun tümünde, kontrol grubunda ise sadece 1 olguda ölçülebilir düzeylerdeydi. IL-1 β ve IL-1Ra çalışmaya alınan tüm olgularda ve kontrol grubunda ölçülebilir düzeylerdeydi.

TNF- α düzeyleri AVH-A ve AVH-B olguları ile karşılaştırıldığında FH'lerde anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0.01$, $p < 0.001$).

IL-1 β ve IL-1Ra düzeyleri yönünden AVH, FH ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

AVH-A ve AVH-B olguları arasında da sitokin düzeyleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı (Tablo 2).

TABLO 2. Hepatitli Olgularda Serum Sitokin Düzeyleri (pg/ml)

	TNF- α	IL-1 β	IL-1Ra
AVH-B (n=9)	58 \pm 138 (0-400)	67 \pm 69 (0-242)	903 \pm 1022 (98-3239)
AVH-A (n=14)	144 \pm 445 (0-1687)	87 \pm 120 (0-414)	948 \pm 786 (109-2335)
FH (n=6)	2689 \pm 3407 (28-8000)	185 \pm 368 (18-938)	802 \pm 500 (148-1409)
Kontrol (n=14)	1.7 \pm 6.4 (0-24)	74 \pm 46 (28-148)	206 \pm 77 (127-359)

Sitokin düzeyleri ile ALT ve AST arasında anlamlı ilişki saptandı.

AVH-A ve AVH-B ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında FH'lerde IL-1Ra/IL-1 β oranı anlamlı farklılık göstermedi.

Tartışma

Fulminan hepatit karaciğerin massif nekroenflamasyonu ve yüksek mortalite ile karakterize ciddi bir klinik tablodur (6).

Yapılan in vitro çalışmalarda HBV'nin direkt sitopatik etkisi olmadığı gösterilmiştir (7).

TNF- α ve IL-1 β gibi enflamatuvar etkili sitokinlerin karaciğer hastalıklarının patofizyolojisinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (1).

Yardımcı T lenfositleri ve HLA sınıf-I ile kısıtlanmış CTL cevabının HBV klirensi ve karaciğer hasarında önemli olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (8-10).

Sekiyama ve arkadaşları (11) IL-1 β ve IL-1Ra düzeylerini FH'li olgularda, AVH'li olgular ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlar ve fulminan hepatitli yaşayan olgularda göre ölen olgularda IL-1Ra/IL-1 β oranının anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir.

Buna karşılık çalışmamızda IL-1 β , IL-1Ra düzeyleri ve IL-1Ra/IL-1 β oranlarını farklı bulduk. Bunun kullandığımız kitlerin duyarlılığından, semptomların başlangıcı ile hastaneye başvuru arasında geçen farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda fulminan hepatitli 6 olgunun 3'ünde (%50) serum TNF- α düzeylerini yüksek bulduk. Günümüze kadar hepatitli olgularda yapılan sitokin çalışmalarında çelişkili sonuçlar saptanmıştır. Bununla birlikte akut viral hepatitli olgularla karşılaştırıldığında fulminan hepatitli olgularda sıklıkla daha yüksek TNF- α düzeyleri bildirilmiştir (11-14).

Fulminan hepatitli olgularda saptanan yüksek TNF- α düzeylerinin açıklanmasında çeşitli görüşler vardır. Klirens mekanizmasının bozulması sonucu TNF- α düzeyleri yükselmiş olabilir (12). TNF- α , hepatositlerde ICAM-1, VCAM-1 gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak veya doğrudan hepatositlerde sitoliz yaparak fulminan hepatite neden olabilir (15-17).

Sitotoksik T lenfositlerinin sitolitik etkilerinin genellikle apoptozis yolu ile olduğu kabul edilmektedir (8-10).

Bu olayın hepatosit yüzeyinde bulunan Fas ile aktive CTL tarafından eksprese edilen FasL arasındaki etkileşim ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (18).

HBV transgenik farelere HBV antijenine spesifik CTL vererek hepatositlerde apoptozis ve bunun sonucu fulminan hepatit oluşturulmuştur (9).

TNF- α 'nın FasL ile yüksek düzeyde aminoasit homolojisi gösterdiği bilinmektedir. Bu TNF- α 'nın apoptozis endüksiyonundaki rolünü desteklemektedir (18). Karaciğer hücrelerinde TNF- α 'nın apoptotik ve nekrotik hasar yapabildiği ve bu etkilerini hedef hücre yüzeyinde eksprese edilen TNFR1 (p55) ve TNFR2 (p75) moleküllerine bağlanarak oluşturduğu gösterilmiştir (19).

Sonuç olarak fulminan hepatitli olgularda TNF- α 'nın yüksek düzeyde ekspresyonunun enflamasyonun doğal sonucu mu, yoksa karaciğer hücrelerinin hasarlanmasının bir nedeni mi olduğunu kesinlikle söylemek güçtür. Bununla beraber bu bilgilerin ışığı altında fulminan hepatitlerin bir kısmında yüksek TNF- α düzeylerinin endüklemediği bir apoptozisin söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Andus T, Bauer, Gerok W: Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*, 1992, 13: 364-75.
2. Busam KJ, Homfeld A, Zawatzky R et al: Virus-vs endotoxin-induced activation of liver macrophages. *Eur J Biochem*, 1990, 191: 577-82.
3. Decker K: Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*, 1990, 192: 245-61.
4. Trey C, Davidson CS: The management of fulminant hepatic failure. Popper H, Schaffner F, eds. In *Progress in liver disease*. 1970; 282-98. Grune and Stratton, New York.
5. Towbin H, Schmitz A, Oostrum J et al: A monoclonal antibody based ELISA for the human interleukin-1 receptor antagonist: its application to measure hIL-1ra levels in monocytic cultures in synovial fluids. *J Immunol Methods*, 1994, 170: 125-35.
6. Bernuau J, Benhamou JP: Fulminant and subfulminant liver failure. McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J, eds. In *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. vol. 2, 1991; 903: Oxford University Press, Oxford.
7. Bonnino F, Brunetto Mr: Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B. *J Hepatology*, 1993, 18: 5-8.
8. Ando K, Guidotti LG, Wirth S et al: Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol*. 1994, 152: 3245-53.
9. Chisari FV: Hepatitis B virus transgenic mice models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996, 206: 149-73.
10. Ando K, Moriyama T, Guidotti LG et al: Mechanisms of class-I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med*. 1993, 178: 1541-54.
11. Sekiyama KD, Yoshihara M, Thomson AW: Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol*, 1994, 98: 71-7.
12. Torre D, Zeroli C, Giola M et al: Serum Levels of Interleukin-1 α , Interleukin-1 β , Interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis. *CID*, 1994, 18: 194-8.
13. Cacopardo B, Fatuzzo F, Russo R et al: Serum tumor necrosis factor in acute and fulminant hepatitis B. *JID*, 1992, 166: 448-9.
14. Müller C, Zielinski CC: Impaired Lipopolysaccharide-inducible tumor necrosis factor production in vitro by peripheral blood monocytes of patients with viral hepatitis. *Hepatology*, 1990, 12: 1118-1124.
15. Morita M, Watanabe Y, Akaike T: Inflammatory Cytokines upregulate intercellular Adhesion Molecule-1 Expression on Primary cultured mouse hepatocytes and T-lymphocyte adhesion. *Hepatology*, 1994, 19: 426-31.
16. Watanabe Y, Morita M, Kematsu N et al: Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β but not interferon gamma induce vascular cell adhesion molecule-1 expression on primary cultured murine hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209: 335-42.
17. Shiratori Y, Tanaka M, Hai K et al: Role of endotoxin-responsive macrophages in hepatic injury. *Hepatology*, 1990, 11: 183-92.
18. Nagata S, Suda T: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today*, 1995, 16: 39-43.
19. Leist M, Gantner F, Jilg S et al: Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol*, 1995, 154: 1307-16.