

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2021;14 (2): 262-273

doi: 10.26559/mersinsbd.796228

İnsan sitomegalovirüs/ epstein-barr virüs koenfeksiyonunun kronik hepatit b hastalarının karaciğer fonksiyonları üzerine olası etkileri

 Zehra Oksuz¹,  Mehmet Sami Serin¹,  Serkan Yaras²,  Enver Ucbilek²,
 Orhan Sezgin²

¹Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji AD

Amaç: İmmünsüprese hastalarda fırsatçı enfeksiyonun yaygın patojenleri olan İnsan Sitomegalovirüs (HCMV) ve Epstein-Barr virüsün (EBV) immünokompetan konakçıda yeniden aktivasyonu genellikle asemptomatiktir, ancak kronik hastalığa neden olan HBV gibi virüslerle koenfeksiyonu hastalığın prognozunu kötü etkileyebilir. Bu çalışmada histolojik aktivite indeksi bilinen kronik HBV hastalarında HCMV/EBV enfeksiyon prevalansının, koenfeksiyonun risk faktörlerinin ve bunların hastaların karaciğer fonksiyonlarına olası etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. **Yöntem:** Çalışmaya 142 kronik HBV (KHB), 20 HBV'ye bağlı siroz ve 4 HBV'ye bağlı hepatosellüler karsinoma (HSK) tanısı alan toplam 166 hasta retrospektif olarak dâhil edildi. HCMV/EBV DNA amplifikasyonu, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile hasta serumlarından belirlendi. **Bulgular:** Çalışmaya dâhil edilen HBV hastalarının %3.01 HCMV tespit edilirken, %6.02 EBV tespit edilmiştir. HCMV ile koenfekte KHB hastalarında alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri koenfeksiyonu olmayan hastalara nazaran daha yüksek bulunmuşken ($p<0.05$), EBV ile koenfekte hastalar ile olmayanlar arasında ALT seviyesi açısından bir fark bulunmamıştır. HCMV/EBV koenfekte hastaların histolojik aktivite skorları HCMV/EBV koenfeksiyonu olmayanlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda HCMV/EBV koenfeksiyonu olan hastaların HBV DNA yükleri koenfeksiyonu olmayan hastalara kıyasla daha az bulunmuştur. **Sonuç:** Bu çalışma immünsüprese KHB hastalarının yanında immünkompetan KHB hastalarında da HCMV/EBV koenfeksiyonunun önemli olabileceğini göstermiştir. Kronik HBV hastalarında HCMV/EBV koenfeksiyonunun düşük HBV DNA seviyelerine rağmen histolojik aktivite skorlarının yüksek bulunması karaciğer hasarını arttırdığını ve prognozu kötü etkilediğini göstermektedir. Bu yüzden KHB hastalarının HCMV/EBV enfeksiyonu için yüksek risk grupları olarak kabul edilmesi ve bu enfeksiyonlar yönünden takip edilerek tedavi edilmesi hastalığın kötü prognozunu değiştirmede kritik öneme sahip olacağı görüşündeyiz.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virus, insan sitomegalovirüs, epstein-barr virus, fibroz, gerçek zamanlı PZR

Başvuru Tarihi: 21.08.2020

Kabul Tarihi: 29.04.2021

Sorumlu Yazar: Zehra Öksüz, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tlf: 0324 3412815 (12160), E-posta: zehraoksz@gmail.com

Possible effects of human cytomegalovirus/epstein-barr virus coinfection on the liver functions of chronic hepatitis b patients

Abstract

Aim: The reactivation of Human Cytomegalovirus (HCMV) and Epstein-Barr Virus (EBV), which are the common pathogens of opportunistic infection in immunosuppressed patients, is usually asymptomatic in the immunocompetent host, but may seriously affect the prognosis of the disease with viruses like HBV, which causes chronic diseases. The purpose of this study was to determine the prevalence of HCMV/EBV infection, the risk factors of coinfection, and their effects on the liver functions of chronic HBV patients whose histological activity index are known. **Method:** A total of 166 patients, 142 diagnosed with chronic HBV (CHB), 20 with HBV-related cirrhosis and 4 with HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC), were retrospectively included in this study. The HCMV/EBV DNA expression was determined from the patient serums with real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). **Results:** It was determined that 3.01% of the HBV patients, who were included in the study, were identified as HCMV, and 6.02% were EBV. The Alanine Aminotransferase (ALT) levels of the CHB patients who were coinfecting with HCMV were higher than those who were not infected; and there were no differences in terms of the ALT levels between those who were coinfecting with EBV and who were not. Histological activity scores of the patients who were coinfecting with HCMV/EBV were higher than those without HCMV/EBV coinfection. Meanwhile, the HBV DNA loads of the patients with HCMV/EBV coinfection were lower than the patients without it. **Conclusion:** This study showed that HCMV/EBV coinfection may be important in immunocompromised CHB patients as well as in immunosuppressed CHB patients. Despite the low HBV DNA levels in CHB patients with HCMV/EBV coinfection, high histological activity scores show that they increase liver damage and affect prognosis poorly. For this reason, we believe that accepting and treating CHB patients as high risk groups for HCMV/EBV infection and following-up and treating them for these infections will have critical importance in changing the poor prognosis of the disease.

Keywords: Hepatitis B virus, human cytomegalovirus, epstein-barr virus, fibrosis, real-time PCR

Giriş

Hepatit, hepatotropik ve hepatotropik olmayan virüsler, ilaçlar, metabolik hastalıklar ve otoimmün nedenlerden kaynaklanan, karaciğerin yaygın bir inflamatuvar sürecidir. Bu süreç siroz ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilen fibroz ile sonuçlanır. Histolojik fibroz evresinin bilinmesi, kronik hepatit hastalığının ciddiyeti ve ilerlemesinin belirlenmesinde prognostik öneme sahiptir¹. Karaciğerin en önemli enfeksiyöz ajanları virüslerdir. Bunlar özellikle hepatit A, B, C ve E virüslerini içerir. Bu enfeksiyonların hepsinde, hepatit ve karaciğer hasarı, karaciğerdeki virüse bağışıklık tepkisinin bir sonucu olarak ortaya çıkar². Karaciğer hasarına neden olan viral ajanlar hepatit A –

E gibi klasik hepatotropik virüslerle sınırlı değildir. Özellikle Herpes familyasına ait insan *sitomegalovirüs (HCMV)* ve *Epstein-Barr virüs (EBV)* gibi hepatotropik olmayan birkaç virüs de hepatite neden olabilir. Bu virüsler aminotransferazlarda hafif ve geçici yükselmelerden akut hepatite ve zaman zaman akut karaciğer yetmezliğine ve fulminan hepatite kadar değişebilen karaciğer hasarına neden olabilirler. Klinik tablo klasik hepatotropik virüslerle ilişkili olandan ayırt edilemeyebilir³. Özellikle immün kontrol kaybı HCMV ve EBV hepatitinde ve diğer fırsatçı viral enfeksiyonlarda hepatit gelişiminden sorumlu olabilir. Polakos ve ark⁴, bu mekanizmayı karaciğer dışındaki bölgelere sınırlı bir viral enfeksiyona cevap olarak üretilen viral spesifik CD8⁺ T hücrelerinin, karaciğerde viral antijen yokluğunda T-

hücre aracılı hepatiti tetikleyebilir olduğunu göstererek açıklamışlardır.

Genellikle, hepatit vakalarının yaklaşık %15 ile %60'ı hepatotropik olmayan virüs kaynaklıdır. EBV ve HCMV enfeksiyonları tüm dünyada çok yaygındır. HCMV, yetişkinlerin %60-70'ini etkilerken, EBV %90'ını etkiler. Bu virüsler immünsüprese hastalarda viral morbidite ve mortalite sebebi olabilen fırsatçı enfeksiyonlar yapabilirler. İmmünkompetan hastalarda latent enfeksiyon olarak semptom göstermeden kalabilirler. Ancak bazı araştırmalarda immünkompetan hastalarda HCMV/EBV'ün neden olduğu hepatit vakaları bildirmiştir^{1,5}. Özellikle immünkompetan kronik hepatit B hastalarında tedavi seçeneklerine karar vermek ve hastanın prognozunu değerlendirmek için tam viral etiyolojinin oluşturulması gerekir. Enfeksiyonun erken tanınması, tedavi ve enfeksiyonun önlenmesi bu hastalarda sonucu değiştirmede kritik öneme sahiptir.

Bu çalışma ile histolojik aktivite indeksi (HAI) bilinen (F:fibroz, NI:Nekroinflamatuvar) HBV ile ilişkili kronik karaciğer inflamasyonu olan hastalarda HCMV ve EBV enfeksiyon prevalansının, koenfeksiyonun risk faktörlerinin ve bunların hastaların karaciğer fonksiyonlarına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Klinik örnekler

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde Mart 2015-Eylül 2017 yılları arasında 142 KHB, 20 HBV'ye bağlı siroz ve dört HBV'ye bağlı HSK tanısı alan 56'sı kadın 110'u erkek toplam 166 hasta retrospektif olarak dâhil edildi. Hepatit B hastalarının 71 tanesi daha önce tedavi almamış naif hasta iken, 95 tanesi antiviral tedavi almıştır. Hastaların kullandıkları antiviraller tablo 1'de özetlendi. Hastalara ait demografik özellikler, karaciğer biyopsi sonuçları ve HBV DNA, alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi gibi klinik bilgiler tekrar gözden geçirilerek kayıtlar toplandı (Tablo 2). Çalışmaya hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve HBV DNA'sı pozitif KHB hastaları dâhil edilirken HBV ile ilgisiz kronik karaciğer hastalığı (alkolizm, otoimmünite, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı vb.) olanlar, 18 yaşın altındaki hastalar, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve/veya diğer hepatit virüslerle koenfeksiyonu olanlar dışlanma kriteri olarak kabul edildi. Çalışma Helsinki Deklerasyonu Prensipleri'ne uygun olarak Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi ve her hastadan bilgilendirilmiş onay formu alındı (Tarih: 12.02.2015 ve Karar No.2015/53).

Tablo 1. Tedavi alan hepatit B hastalarının kullandıkları antiviraller

Tedavi alan hepatit b hastaları (n=95)	
Antiviral	Hasta sayısı
ADV	6
Peg-IFN	4
TDF	51
LAM	15
ETV	19

ADV: Adefovir dipivoksil, Peg-IFN: Pegile interferon TDF: Tenofovir, LAM: Lamivudin, ETV: Entekavir

Tablo 2. Hastalara ait demografik ve klinik veriler

Demografik veri (n = 166)	n	%
Cinsiyet		
Kadın	56	33.74
Erkek	110	66.26
Yaş		
Ortalama	56.22±11.41	
Aralık	20-81	
Klinik veri (n=166)	n	%
ALT (IU/l)		
Ortalama	25.43±15.15	
Aralık	8.6- 124	
HBV DNA (IU/ml)		
Aralık	<20-119075300	
Siroz		
Evet	20	12.04
Hayır	146	87.95
HSK		
Evet	4	2.41
Hayır	162	97.59
Fibroz Skor		
F0	6	4.22
F1	35	24.64
F2	38	26.76
F3	32	22.53
F4	31	21.83
Ortalama	2.33±1.18	
Aralık	0/6-5/6	
NI Skor		
Minimum (1-3)	17	11.97
Hafif (4-8)	77	54.22
Orta (9-12)	31	21.83
Belirgin (13-18)	17	11.97
Ortalama	6.76±3.38	
Aralık	2/18-18/18	

NI:Nekroinflamatuvar, HSK: Hepatosellüler karsinoma, ALT: Alanin aminotransferaz

HBV DNA izolasyonu

Bu çalışmada, daha önceki bir çalışmamız için MagJET viral DNA ve RNA (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kiti kullanılarak 200 µl serum örneklerinden HBV DNA ekstraksiyonu ve ardından amplifikasyonu yapılarak HBV DNA'sı tespit edilen ve başka çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklanan arşiv DNA

ekstraktları kullanıldı.⁶ Hastalara ait HBV DNA ve ALT/AST bilgileri serumun alındığı tarihte hastalardan istenen testlerden hastane kayıtlarından elde edildi. Ayrıca HBV DNA ekstraksiyonu ve HCMV ve EBV ölçümleri, HBV DNA, ALT/AST değerlerinin ölçüldüğü aynı serum örneğinden yapıldı.

Biyopsi örneklerinin histolojik değerlendirilmesi

HBV hastalarına önceden yapılan karaciğer biyopsileri standart bir yöntemle deneyimli gastroenterologlar tarafından gerçekleştirildi ve şekilleri, büyüklükleri ve sayıları kaydedildi⁷. Histoloji, Ishak skorlama sistemine göre HAI ile derecelendirildi. Buna göre NI skoru (0-18); 1-3: minimal, 4-8: hafif, 9-12: orta, 13-18: belirgin iken F skoru (0-6); F0: fibroz yok, F1:hafif, F2: hafif/orta, F3:Orta, F4:şiddetli, F5:inkomplet siroz, F6:olası veya kesin siroz olarak analiz edildi⁸.

HCMV/EBV DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu

HCMV ve EBV DNA'sı üretici firmanın talimatları doğrultusunda Thermo Scientific MegJET Viral DNA ve RNA Kit kullanılarak 200 µL serum örneklerinden ekstrakte edildi ve amplifikasyonu yapılanaya kadar -20 °C'de saklandı. HCMV amplifikasyonu için forward (5'-GCGCGTACCGTTGAAAGAAAAGCATAA-3') ve reverse primerler (5'-TGGGCACTCGGGTCTTCATCTCTTTAC-3')⁹, EBV amplifikasyonu için ise forward (5'-AGGATGCGATTAAGGACCTTGTT -3') ve reverse primerler (5'-GGAAACCAGGGAGGCAAATCT -3')¹⁰ ve SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)- Thermo Scientific) reel-time PCR için kullanıldı. PCR reaksiyonu ilk olarak 95 °C'de 10 sn sonrasında 45 döngü için 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 30 sn boyunca gerçekleştirildi ve QuartStudio^{DM}-Real-time PCR yazılımı ile analiz edildi. Her örnek için RT-PCR 2 kez tekrar edildi.

Pozitif kontrol

Pozitif kontrol olarak Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalında HCMV veya EBV tanısı alan parafinli doku örnekleri kullanıldı. Parafinli doku örneklerinden DNA izolasyonu için, Ryan ve arkadaşlarının¹¹ metodu modifiye edilerek kullanıldı. Ekstre edilen DNA kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

İstatistiksel analiz ve değerlendirme

HCMV pozitif ve negatif hastalar ile EBV pozitif ve negatif hastalar arasındaki farkın belirlenmesi için Student *t* testi kullanıldı ve iki grup arasındaki herhangi bir farkın öneminde *p*<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışma grubunun özellikleri

Çalışmaya 142 KHB, 20 HBV'ye bağlı siroz ve 4 HBV'ye bağlı HSK'lı toplam 166 hasta dâhil edildi. 3'ü siroz olmak üzere toplam 5 hastada (%3.01) HCMV tespit edilirken, 3 siroz ve 1 HSK'lı toplam 10 hastada (%6.02) EBV tespit edildi. Çalışmaya dâhil olan HCMV ile koenfekte hastaların yaş ortalaması 53.0±7.84, EBV ile koenfekte hastalarının yaş ortalaması ise 60.9±5.38 olarak bulundu. Ayrıca HCMV tespit edilen 5 hastanın 2'si kadın 3'ü erkek, EBV tespit edilen 10 hastanın ise 3'ü kadın 7'si erkektir (Tablo 3).

Tablo 3. HCMV/EBV koenfekte KHB hastalarının demografik özellikleri

	HCMV Koenfekte Hastalar (n: 5)	EBV Koenfekte Hastalar (n:10)
Yaş		
Ortalama	53.0±7.84	60.9±5.38
Aralık	44-60	55-68
Cinsiyet		
Kadın	2	3
Erkek	3	7
HCMV:İnsan Sitomegalovirüs; EBV: Epstein-Barr Virüs		

HCMV/EBV pozitif hastaların histolojik aktivite skorları

HCMV ile koenfeksiyon tespit ettiğimiz toplam 5 hastanın ortalama NI ve F

skorları sırasıyla, 10/18 ve 4.4/6'dır. HCMV ile koenfeksiyon tespit ettiğimiz KHB hastalarında F skorları orta (3/6), şiddetli (4/6) ve yüksek (siroz) düzeydeyken orta düzey NI (10/18) skorları vardı (Tablo 4).

EBV ile koenfeksiyon tespit ettiğimiz toplam 10 hastanın ortalama NI ve F skorları

sırasıyla, 8.16/18 ve 3.6/6'dır. EBV ile koenfeksiyon tespit ettiğimiz KHB hastalarında F skorları hafif/orta (2-3/6) ve yüksek (siroz-HSK) düzeydeyken hafif/orta (4,5,7,8,12/18) ve belirgin (13/18) düzey NI skorları vardır (Tablo 5).

Tablo 4. HCMV koenfekte KHB hastalarının klinik özellikleri

Vaka No	NI Skor	F Skor	ALT (IU/l)	HBV DNA (IU/ml)	Siroz	HSK
C 1	-	-	27	441	+	-
C 2	-	-	30	<20	+	-
C 3	10	3	49.1	<20	-	-
C 4	-	-	17.9	<20	+	-
C 5	10	4	20.6	<20	-	-

NI:Nekroinflamatuvar, HSK: Hepatosellüler karsinoma, ALT: Alanin aminotransferaz, HBV: Hepatit B Virus, F: Fibroz

Tablo 5. EBV ile enfekte KHB hastalarının klinik özellikleri

Vaka No	NI Skor	F Skor	ALT (IU/l)	HBV DNA (IU/ml)	Siroz	HSK
E 1	-	-	25	<20	+	-
E 2	12	3	23	26	-	-
E 3	5	3	32.5	<20	-	-
E 4	-	-	37.5	<20	-	+
E 5	8	3	22.5	<20	-	-
E 6	7	2	35.7	42	-	-
E 7	-	-	8.1	<20	+	-
E 8	13	3	8.9	<20	-	-
E 9	-	-	16.2	<20	+	-
E 10	4	2	33	23	-	-

NI:Nekroinflamatuvar, HSK: Hepatosellüler karsinoma, ALT: Alanin aminotransferaz, HBV: Hepatit B Virus, F: Fibroz

Çalışmaya katılan tüm hastaların ortalama NI ve F skorları (NI: 6.76±3.38 ve F: 2.33±1.18) (Tablo 2) değerlendirildiğinde

HCMV/EBV koenfeksiyonu tespit ettiğimiz hastaların HAI skorları bu iki virüsten her hangi biriyle koenfeksiyon tespit

etmediklerimizden yüksek bulunmuştur. Özellikle HCMV ile koenfeksiyon tespit ettiğimiz hastaların koenfeksiyonu olmayan KHB hastalarıyla arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur ($p<0.05$).

HCMV/EBV pozitif hastaların serum ALT seviyeleri

Çalışmaya dahil edilen HCMV koenfeksiyonu olan KHB hastalarının serum ALT seviyelerinin ortalaması (28.92 ± 12.27), HCMV koenfeksiyonu olmayanların ALT

seviyesi ortalamasından (23.41 ± 15.23) daha yüksek olduğu saptandı. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Tablo 6).

EBV koenfeksiyonlu KHB hastalarının serum ALT seviyeleri ortalaması (24.24 ± 10.63) ile EBV koenfeksiyonu olmayan hastaların serum ALT seviyeleri ortalaması (24.60 ± 11.40) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 6).

Tablo 6. HCMV/EBV koenfeksiyonu olan KHB hastalarının ortalama ALT seviyeleri

	HCMV		EBV	
	HCMV Pozitif (n: 5)	HCMV Negatif (n:161)	EBV Pozitif (n: 10)	EBV Negatif (n: 156)
ALT (UI/l)				
Ort.	28.92±12.27	23.41±15.23	24.24±10.633	24.60±11.41
Aralık	(17.9-49.1)	(8.6- 124)	(8.1- 37.5)	(8.6- 124)

HCMV:İnsan Sitomegalovirüs; EBV: Epstein-Barr Virüs

HCMV/EBV koenfeksiyonu olan hastaların HBV DNA seviyeleri

Çalışmaya dahil edilen tüm KHB hastalarının HBV DNA aralığı $<20-119075300$ IU/ml'dir (Tablo 2). Bu aralığın geniş olma nedeni çalışmaya dahil edilen 71 hasta daha önce herhangi bir antiviralle tedavi almamışken 95 hastanın çeşitli antivirallerle tedavi almasından kaynaklanmaktadır (Tablo 1). HCMV pozitif 5 hastanın 4 tanesi tedavi almışken (HBV DNA <20 IU/ml) 1 tanesi tedavi almamıştır (HBV DNA 441 IU/ml). EBV pozitif 10 hastanın hepsi antiviral tedavi almıştır ve 7 tanesinin HBV DNA'sı <20 IU/ml'den düşükken 3 tanesi sırasıyla 23, 26 ve 42'dir (Tablo 4-5).

Tartışma

HCMV ve EBV hafif semptomlu ya da semptomsuz ilk enfeksiyondan sonra latent olarak kalıp immünsüpresif kişilerde aktive olarak fırsatçı enfeksiyonlar yaparlar. İmmünsüpresif ilaçlar, yüksek doz kortikosteroidler, T-hücre tükenmesi, virüs

koenfeksiyonu HCMV ve EBV enfeksiyonları için en yaygın risk faktörleri olarak tanımlanır^{12,13}.

İnsan viral enfeksiyonlarının patogenezi değiştiren virüs-virüs etkileşimleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. HCMV ve KHB ilişkisini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır¹⁴⁻¹⁶. Hu ve arkadaşları¹⁵ yaptıkları çalışmada HBV enfeksiyonuna bağlı kronik karaciğer yetmezliği olan 878 hastada HCMV ve EBV koenfeksiyonunu araştırmış ve %5 HCMV, %23 EBV koenfeksiyonu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu araştırmacının çalışmasıyla uyumlu olarak EBV koenfeksiyonu (%6.02) HCMV koenfeksiyonuna (%3.01) göre daha yüksektir. Bu araştırmacıların yaptığı çalışmada EBV yüzdesinin çalışmamızdan daha yüksek çıkmasının nedeni çalışmalarına dahil ettikleri hasta sayısı (n=878) ile ilişkili olması muhtemeldir..

HAI skorları HBV gibi kronikleşebilen hastalıklarda karaciğer hasarının en güçlü göstergeleridir. Özellikle F skorlarının bilinmesi hastalığın siroz ve HSK gibi aşamalarında tanı koydurucudur⁸. HCMV/EBV koenfeksiyonu olan hastaların HAI skorlarını genel olarak incelediğimizde her iki grupta da F skorları şiddetli, NI skorları yüksek ve orta düzey bulunmuştur. F skorları açısından değerlendirildiğinde HCMV/EBV koenfeksiyonu olan hastalar ile koenfeksiyonu olmayan hastalar arasında anlamlı istatistiksel fark vardır ($p<0.05$).

Daha önce yapılmış çalışmalarda HCMV koenfeksiyonunun sirozu olan hastalarda karaciğerle ilişkili ölüm riskini arttırdığı ayrıca HSK sıklığı üzerinde hiçbir etkisi olmamasına rağmen daha agresif karaciğer tümörleri ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir¹⁷⁻¹⁹. Başka bir çalışma HCMV ile koenfekte KHB hastalarının HAI skorlarının HCMV koenfeksiyonu olmayan KHB hastalarına oranla yüksek olduğunu bildirmiştir¹⁴. Bizim bulgularımızda bu araştırmalarla uyumludur. Ancak Hu ve ark¹⁵ HBV ile koenfekte HCMV'nin, HBV poliferasyonunu inhibe ettiğini ve karaciğer hasarını azaltabileceğini ileri sürmüştür.

EBV ile KHB koenfeksiyonu üzerine yapılmış çalışmalar HCMV koenfeksiyonu üzerine yapılmış çalışmalara kıyasla azdır. An ve ark²⁰ HBV (%9.10) enfeksiyonu ile karşılaştırıldığında, HBV ile ilişkili karaciğer sirozu ve (%40) ve HSK'lı (%25) hastalarda EBV koenfeksiyonunun daha fazla olduğunu bulmuştur. Bulgularımız bu araştırmacılar ile uyumludur. Önceki çalışmalar EBV enfeksiyonunun akut karaciğer yetmezliğine neden olduğunu bildirmiştir^{21,22}. Aynı zaman da Hu ve ark¹⁵ EBV ile koenfeksiyonu olan KHB hastalarının koenfeksiyonu olmayan hastalara oranla düşük albümin seviyesi ile daha yüksek Child-Pugh skora sahip olduğunu bunun da karaciğer hasarını arttırarak HBV ile ilişkili kronik karaciğer yetmezliği olan hastalarda kötü prognozu indüklediğini bildirmişlerdir. HCMV/EBV koenfeksiyonunun sirozla ilişkisi birçok çalışmayla gösterilse de hem HCMV hem de EBV ile siroz arasındaki ilişkinin altta yatan mekanizmasının daha çok çalışmayla aydınlatılması gerekmektedir.

HCMV/EBV ile koenfeksiyonu olan hastaların bu iki enfeksiyondan herhangi biri ile enfekte olmayan hastalardan daha düşük HBV DNA'ya sahip olduklarını bulduk. Her iki koenfeksiyonda da hastaların çoğunun sahip olduğu HBV DNA seviyesi <20 IU/ml'dir (Tablo 4-5). Daha önce yapılan çalışmada HCMV tarafından üretilen sitokinlerin HBV replikasyonunu ve gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir²³. Yapılan bir çalışmada HCMV'nin neden olduğu inflamasyonun KHB enfeksiyonu sırasında viral temizlenmeye katkıda bulunabileceği gösterilmiştir¹⁴. Çalışmamızda HCMV pozitif 5 hastanın 4 tanesinin antiviral tedavi alması nedeniyle HBV DNA seviyeleri düşüktür. Bu nedenle bizim bulgularımızla HCMV'nin neden olduğu inflamasyonun KHB enfeksiyonu sırasında viral temizlenmeye katkıda bulunabileceği yorumunu yapmak doğru olmayacaktır. Bunun yanı sıra başka bir çalışmada ise HBV DNA <1000 IU/ml olması HCMV replikasyonunu kolaylaştırdığı ortaya konmuştur¹⁵. Bu bilgidan yola çıkarak bizim çalışmamızda HCMV pozitif 4 hastanın antiviral tedavi alması nedeniyle HBV DNA seviyeleri düşük olması bu hastalardaki HCMV pozitifliğini açıklayabilir.

HCMV-HBV koenfeksiyonu aksine EBV-HBV koenfeksiyonunda HBV DNA replikasyonu ile EBV arasındaki ilişki açık değildir ve altta yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Bizim bulgularımızın aksine yapılan bir olgu sunumunda EBV-HBV koenfeksiyonu bulunan hastada aktif HBV replikasyonu ve EBV replikasyonunun inhibisyonunu tespit etmişlerdir²⁴. EBV-HBV koenfeksiyonunun altında yatan mekanizma daha fazla araştırması gerekmektedir.

Çalışmamızda 10 EBV ve 5 HCMV pozitif KHB hastasının sırasıyla 7 ve 3 tanesi erkektir. Hu ve ark¹⁵ özellikle 60 yaş üzerinin EBV enfeksiyonu için bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmada 60 yaş üstü hastalarda EBV-1 enfeksiyon oranının <40 yaş gurubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmiştir²⁵. Başka bir çalışma da HCMV seropozitiflik oranının yaşla birlikte arttığını bildirmiştir²⁶. Bizim bulgularımız da bu çalışmaları desteklemektedir. Bu durum bağışık sisteminin ve konakçı ortamının yaşla birlikte değiştiği ve dolayısıyla latent

eksiyonların tekrar aktive olduğu şeklinde açıklanabilir.

Aminotransferazlar (ALT, AST) hepatositlerde sentezlenen karaciğer enzimleridir. Bu enzimlerin belli oranlarda artması hepatosellüler hasarı belirlemede önemlidir. Özellikle ALT artışının baskın olduğu karaciğer kaynaklı nedenler Kronik Hepatit C (KHC) ve KHB'dir. ALT sitozolik bir enzimdir ve göreceli olarak karaciğer spesifiktir²⁷. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) raporuna göre sağlıklı yetişkinlerde ALT için normalin üst sınırlarının erkekler için 29-33 U/L ve kadınlar için 19-25 U/L olduğu bildirilmektedir²⁸.

Bayram ve ark¹⁴ yaptığı çalışmada HCMV ile koenfeksiyonu olan HBV hastalarının ortalama ALT seviyesinin (115.4 IU/I) koenfeksiyonu olmayan hastalardan (120.6 IU/I) daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Hu ve ark¹⁵ yaptığı çalışmada HCMV ile koenfeksiyonu olan HBV enfeksiyonuna bağlı kronik karaciğer yetmezliği hastalarının ortalama ALT seviyesinin (34 IU/I) koenfeksiyonu olmayanlardan (166 IU/I) daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yalnızca ALT seviyesinin HCMV enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı makalede HCMV enfeksiyonunun HBV proliferasyonunu inhibe edebileceğini, inflamatuvar aktiviteyi azaltabileceğini, karaciğer hasarını azaltabileceğini ve ALT seviyelerini azaltabileceğini öne sürülmüştür. Yaptığımız çalışmada bu araştırmalardan farklı olarak, HCMV ile koenfeksiyonu olan hastaların ortalama ALT seviyesinin (28.92±12.27IU/I) koenfeksiyonu olmayan hastalardan (23.41±15.23 IU/I) daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Aynı zamanda Hu ve ark¹⁵ yaptıkları çalışmada EBV-HBV koenfeksiyonu olan hastalarda ortalama ALT seviyesinin (162 IU/I) EBV koenfeksiyonu olmayanlardan (153 IU/I) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Rao ve ark²⁴ yaptığı olgu sunumunda EBV-HBV koenfeksiyon vakasında yüksek ALT oranı gördüklerini ve bunun da şiddetli karaciğer hastalığı ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bununla

birlikte, klinik deneyimlerinde HBV-EBV koenfeksiyonlu hastalarda daha yüksek ALT oranı gördüklerini de belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada bu araştırmacılarınkinden farklı olarak, EBV ile koenfeksiyonu olan hastaların ortalama ALT seviyesi (24.24±10.63 IU/I) ile EBV koenfeksiyonu olmayanlar (24.60±11.40 IU/I) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu farkların, diğer araştırmacıların^{14,15,24} çalışmalarına dahil ettikleri hastaların ortalama ALT değerlerinin bizim çalışmamıza katılan hastaların değerlerinden çok daha yüksek olmasıyla alakalı olduğunu düşünmekteyiz. Genel itibariyle bizim çalışmamıza dâhil olan hastaların çoğunun antiviral tedavi almalarından kaynaklı olarak zaten ortalama ALT seviyeleri düşüktür (25.43±15.15 IU/I). Çalışmamızda HCMV koenfeksiyonu olan hastalarda ortalama ALT düzeyi (28.92±12.27IU/I) olmayanlara oranla her ne kadar yüksek olsa da AASLD'nin belirlediği değerlerin altındadır. Bu yüzden bulgularımız diğer araştırmacıların sonuçlarını dolaylı olarak desteklemektedir. Aynı zamanda her ne kadar bizim çalışmamıza katılan hastaların genel olarak ALT seviyeleri düşük olsa da HCMV koenfeksiyonu olan hastaların ALT seviyelerinin olmayan hastalara göre yüksek bulunması HBV ile enfekte hastalarda kronikleştirmeyi arttırabileceğini düşündürmektedir. Çalışmaya dâhil edilen 20 siroz hastasının 6 tanesinde (3 HCMV, 3 EBV) ve 4 HSK hastasının 1 tanesinde (EBV) koenfeksiyon tespit edilmiş olması bu hipotezi desteklemektedir. Bu konunun aydınlatılması için daha fazla hastanın katıldığı mekanizmayı aydınlatmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, daha önceki çalışmalar immünsüprese bireylerde HCMV/ EBV aktivasyonu üzerine durmaktadır. HBV ile enfekte immünkompetan bireylerde HCMV/EBV koenfeksiyonunun etkileri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışma immünsüprese KHB hastalarının yanında immünkompetan KHB hastalarında da HCMV/EBV koenfeksiyonunun önemli olabileceğini göstermiştir. HCMV koenfeksiyonu olan hastalarda

koenfeksiyonu olmayanlara kıyasla ortalama ALT seviyelerinin yüksek olması HBV ile enfekte hastalarda kronikleştirmeyi arttırabileceğini düşündürmektedir. KHB hastalarında HCMV/EBV koenfeksiyonun düşük HBV DNA seviyelerine rağmen histolojik aktivite skorlarının yüksek bulunması karaciğer hasarını arttırdığını ve prognozu kötü etkilediğini göstermekte ve bu hipotezi desteklemektedir. Daha önceki çalışmalarda HCMV koenfekte KHB hastalarında yüksek HAI skorlarının olduğunu gösterilmiştir. Ancak bildiğimiz kadarıyla HAI skorları bilinen HBV hastaları ile EBV koenfeksiyonun birlikte değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. Bu çalışma HCMV'nin yanı sıra EBV ile koenfekte KHB hastalarında da yüksek HAI skorlarının yüksek olduğunu göstermiştir. Bu yüzden özellikle ileri yaş KHB hastalarının HCMV/EBV enfeksiyonu için yüksek risk grupları olarak kabul edilmesi ve bu enfeksiyonlar yönünden takip edilerek tedavi edilmesi hastalığın kötü prognozunu değiştirmede kritik öneme sahip olacağı görüşündeyiz. Bununla birlikte, HBV hastalarında HCMV ve EBV koenfeksiyonunun etkileri ve altta yatan mekanizmalarının netleştirilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Yazar katkısı: vFikir: Zehra Öksüz, Mehmet S. Serin Tasarım: Zehra Öksüz, Mehmet S. Serin, Materyal/Veri toplama: Orhan Sezgin, Enver Üçbilek, Serkan Yaraş Deneyle: Zehra Öksüz Analiz veya Yorumlama: Mehmet S. Serin Literatür inceleme: Zehra Öksüz, Mehmet S. Serin, Orhan Sezgin, Enver Üçbilek, Serkan Yaraş Yazan: Zehra Öksüz.

Çıkar çatışması/Mali destek: Yazarların bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır. Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Longerich T. Hepatocellular carcinoma. *Pathologie*. 2020;41(5):478-487. doi: 10.1007/s00292-020-00801

2. Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, Zumla A, Ippolito G. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):1045-1062. doi: 10.1016/j.idc.2019.08.004.
3. Noor A, Panwala A, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis caused by herpes viruses: A review. *J Dig Dis*. 2018;19(8):446-455. doi: 10.1111/1751-2980.12640.
4. Polakos NK, Cornejo JC, Murray DA, et al. Kupffer cell-dependent hepatitis occurs during influenza infection. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1169-78. doi: 10.2353/ajpath.2006.050875.
5. Raghav R, Samour J. Inclusion Body Herpesvirus Hepatitis in Captive Falcons in the Middle East: A Review of Clinical and Pathologic Findings. *J Avian Med Surg*. 2019;1;33(1):1-6. doi: 10.1647/2018-341.
6. Oksuz Z, Serin MS, Serin A, Sezgin O, Gonca S. Determination of reverse transcriptase inhibitor nucleoside analogue resistance profile in pretreatment phase of patients with viral hepatitis B. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(2):156-169. doi: 10.5578/mb.67796.
7. Sezgin O, Altıntaş E, Üçbilek E, Tombak A. Percutaneous Liver Biopsies: Safety and Efficacy. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2010;30(4):1287-91. doi: 10.5336/medsci.2009-13508
8. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *J Hepatol*. 2003;38(4):382-6. doi: 10.1002/hep.1840010511.
9. Tan L, Sato N, Shiraki A, et al. Everolimus delayed and suppressed cytomegalovirus DNA synthesis, spread of the infection, and alleviated cytomegalovirus infection. *Antiviral Res*. 2019;162:30-38. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.12.004.

10. Hwang KA, Ahn JH, Nam JH. Development and validation of multiplex real-time PCR assays for rapid detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and polyomavirus BK in whole blood from transplant candidates. *J Microbiol.* 2018;56(8):593-99. doi: 10.1007/s12275-018-8273-2.
11. Ryan JL, Fan H, Glaser SL, Schichman SA, Raab-Traub N, Gulley ML. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J Mol Diagn.* 2004;6(4):378-85. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60535-1.
12. Barcelos F, Martins C, Monteiro R, et al. Association between EBV serological patterns and lymphocytic profile of SjS patients support a virally triggered autoimmune epithelitis. *Sci Rep.* 2021;18;11(1):4082. doi: 10.1038/s41598-021-83550-0.
13. Cassaniti I, Cavagna L, Calarota SA, et al. Evaluation of EBV- and HCMV-Specific T Cell Responses in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Patients Using a Normalized Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay. *J Immunol Res.* doi: 10.1155/2019/4236503.
14. Schuch A, Zecher BF, Müller PA, et al. NK-cell responses are biased towards CD16-mediated effector functions in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2019;70(3):351-360. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.006.
15. Hu J, Zhao H, Lou D, et al. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections, risk factors, and their influence on the liver function of patients with acute-on-chronic liver failure. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):577. doi: 10.1186/s12879-018-3488-8.
16. Lian YL, Wu WF, Shi YM, Liu QC, Tang XP. Preliminary study on relationship between different viral pathogenesis and disease prognosis in patients with severe viral hepatitis. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing DuXueZaZhi.* 1999;13(4):355-7.
17. Faivre M, Cottet V, Bour JB, et al. Study Group. Impact of Cytomegalovirus Infection on the Outcome of Patients With Cirrhosis: A Preliminary Study. *J Clin Gastroenterol.* 2019;53(3):236-241. doi: 10.1097/MCG.0000000000001039.
18. Varani S, Lazzarotto T, Margotti M, et al. Laboratory signs of acute or recent cytomegalovirus infection are common in cirrhosis of the liver. *J Med Virol.* 2000;62(1):25-8. doi: 10.1002/1096-9071(200009)62:1
19. Giacchino R, Navone C, Ciravegna B, Viscoli C, Ferrea G, Facco F. Liver cirrhosis in childhood. Considerations on 22 cases with different etiology. *Pediatr Med Chir.* 1990;12(2):147-52.
20. An H, Zhou XJ, Miu CM. Clinical study on the relationship between EBV infection and liver diseases infected by HBV. *Zhong Xi Yijie He Gan Bing Za Zhi.* 2005;15:144-5.
21. Gallegos-Orozco JF, Rakela-Brödner J. Hepatitis Viruses: Not Always What It Seems to Be. *Rev Med Chil.* 2010;138(10):1302-11.
22. Mellinger JL, Rossaro L, Naugler WE, et al. Epstein-Barr virus (EBV) related acute liver failure: a case series from the US acute liver failure study group. *Dig Dis Sci.* 2014;59(7):1630-7. doi: 10.1007/s10620-014-3029-2.
23. Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Inhibition of hepatitis B virus replication during adenovirus and cytomegalovirus infections in transgenic mice. *J Virol.* 1998;72(4):2630-7. doi: 10.1128/JVI.72.4.2630-2637.
24. Rao SC, Ashraf I, Mir F, Samiullah S, Ibdah JA, Tahan V. Dual Infection with Hepatitis B and Epstein Barr Virus Presenting with Severe Jaundice, Coagulopathy, and Hepatitis B Virus Chronicity Outcome. *Am J Case Rep.* 2017;18:170-172. doi: 10.12659/ajcr.901688.

25. Fan J, Jing M, Yang M, et al. Herpesvirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients sero positive for human cytomegalovirus before transplantation. *Int J Infect Dis.* 2016;46:89-93. doi: 10.1182/blood-2005-11-012864.
26. Ataman S, Çolak D, Günseren F ve ark. Investigation of Cytomegalovirus Seroepidemiology in Antalya With a Population-Based Cross-Sectional Study and Review of Related Data in Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2007;41(4):545-55.
27. Renner EL, Dällenbach A. Increased Liver Enzymes: What Should Be Done?. *Ther Umsch.* 1992;49(5):281-6.
28. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2018;12(1):33-4. doi: 10.1002/hep.29800.