

# Çocukluk Dönemi Wilson Hastalığı ve Kronik Hepatit B Virus Enfeksiyonlarında Karaciğer Dokusu Çinko, Bakır, Demir ve Mangan Konsantrasyonları

## HEPATIC CONCENTRATIONS OF ZINC, COPPER, IRON AND MANGANESE IN CHILDREN WITH WILSON DISEASE AND CHRONIC HEPATITIS B VIRUS INFECTION

Erhun KASIRGA\*, Canan ÇOKER\*\*, Sema AYDOĞDU\*\*\*, Raşit V YAĞCI\*\*\*\*, Baha TANELİ\*\*\*\*

\* Uzm.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Pediatrik Gastroenteroloji BD,

\*\* Doç.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Araştırma Laboratuvarı,

\*\*\* Doç.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Pediatrik Gastroenteroloji BD,

\*\*\*\* Prof.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Pediatrik Gastroenteroloji BD, İZMİR

### Özet

*Bu çalışmanın amacı Wilson hastalığı ve kronik hepatit B virus enfeksiyonlarında karaciğer dokusu çinko (Zn), bakır (Cu), demir (Fe) ve mangan (Mn) konsantrasyonlarının ölçümü ve kıyaslanmasıdır. Karaciğer biyopsi örnekleri perkütan karaciğer biyopsisi ile yaşları 4-14 arasında değişen 36 çocuktan alındı. Örnekler yaş yakma tekniği ile yakıldı ve ICP (Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometry)-AES ile analizleri yapıldı. Sonuçlar üç gruba ayrılarak değerlendirildi. Bunlar; grup 1: normal kontrol grubu (12 olgu), grup 2: Wilson hastalığı grubu (12 olgu), grup 3: kronik B hepatiti grubu (12 olgu) idi. Karaciğer dokusu eser element (Zn, Cu, Fe ve Mn) konsantrasyonlarının analizleri tüm gruplarda yapıldı. Karaciğerdeki Cu içeriği Wilson hastalığı grubunda, kronik B hepatiti ( $p= 0.003$ ) ve normal kontrol grubuna ( $p= 0.001$ ) göre anlamlı şekilde yüksekti. Bu üç grupta karaciğer dokusu eser element konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bazı korelasyonlar saptandı.*

**Anahtar Kelimeler:** Eser elementler, Kronik hepatit B, Wilson hastalığı

T Klin Pediatri 2000, 9:6-9

### Summary

*The objective of this study was to determine and compare the hepatic concentration of zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe) and manganese (Mn) in Wilson disease and hepatitis B virus associated chronic liver disease. Liver biopsy samples were obtained by percutaneous liver biopsy from 36 children ages 4 to 14 years. Samples were wet ashed and analyzed by ICP (Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometry)-AES. Three groups of cases were studied: group 1: normal controls ( $n= 12$ ), group 2: Wilson disease ( $n= 12$ ), group 3: chronic hepatitis B ( $n= 12$ ). Analysis of liver tissue concentrations of trace elements (Zn, Cu, Fe, Mn) were studied in all groups. Copper content in the liver tissue was significantly higher in Wilson disease group than in normal controls, and chronic hepatitis B group ( $p= 0.001$ ,  $p= 0.003$ ; respectively). Some statistically significant correlations were found between hepatic trace element concentrations in these three groups.*

**Key Words:** Trace elements, Chronic hepatitis B, Wilson disease

T Klin J Pediatr 2000, 9:6-9

Metallerin pek çok metalloprotein ve metalloenzimlerin esas komponentleri olduğunun bulunmasından itibaren eser elementlerin biyokimyasal ve nütrisyonel rollerinin önemi yaygın bir şekilde tanımlanmıştır. Örneğin bakır (Cu) gibi bazı eser elementler özellikle kollajen biosentezinde yer alarak kronik karaciğer hastalıklarındaki hepatik fibroze karşı kofaktör gibi hareket ederler.

**Geliş Tarihi:** 15.04.1998

**Yazışma Adresi:** Dr.Erhun KASIRGA  
200 Sokak No:133/5 Hatay, İZMİR

Karaciğer hastalığı kronik hepatitten siroza doğru ilerledikçe serum çinko (Zn) konsantrasyonları azalırken, Cu konsantrasyonları ise artar (1). Literatürde insan, fare ve koyun karaciğeri eser element düzeyleri ile ilgili bazı çalışmalar vardır (2-4). Farelerde yapılan deneysel hepatit ve karaciğer sirozu modellerinde eser element düzeylerinde çeşitli değişiklikler olduğu bildirilmektedir (5-7). Normalde ve çeşitli karaciğer hastalıklarında karaciğer dokusu eser element düzeyleri ile ilgili verilerin çoğu erişkinlerden veya deney hayvanlarından elde edilmiş olup, çocukluk yaş grubuna ait çok az çalışma vardır (8-10).

Bu çalışmada çocukluk dönemi Wilson hastalığı gibi metabolik ve kronik hepatit B gibi viral kökenli kronik karaciğer hastalıklarının karaciğer dokusu çinko (Zn), bakır (Cu), demir (Fe) ve mangan (Mn) düzeyleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Gereç ve Yöntem

1993-1995 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniklerinde çeşitli nedenlerle perkütan karaciğer biyopsisi yapılan 36 olgu üç gruba ayrılarak çalışma kapsamına alınmıştır. Birinci gruptaki karaciğer histopatolojisi normal olan 12 olgunun 8'i erkek, 4'ü kız olup, yaşları 4-12 ortalama  $8.25 \pm 2.26$  yıl (ortalama  $\pm$  standart sapma) arasında değişiyordu. İkinci grupta klinik, laboratuvar ve histopatoloji sonuçlarına göre Wilson hastalığı tanısı alan 12 olgu yer alıyordu. Hastaların 6'sı erkek, 6'sı kız olup, yaşları 6-14 ortalama  $9.75 \pm 2.3$  yıl arasında değişiyordu. Wilson hastalığı, olguların 9'unda (%75) karaciğer hastalığı semptomları ile, ikisinde (%16.6) aile taraması sonucunda, birinde (%8.3) ise ekstrapiramidal semptomlar ve kişilik değişiklikleri ile tanımlandı. Olguların 10'unda (%75) Kayser-Fleischer halkası vardı. Bakır metabolizması test sonuçları (total serum Cu'ı, 24 saatlik idrarda Cu ekskresyonu, serum seruloplazmin'i) incelendiğinde; olguların %83.3'ünde tüm testlerde, %8.3'ünde testlerden ikisinde ve %8.3'ünde ise testlerden yalnızca birinde anormallik vardı. Histolojik bulgular; kronik aktif hepatit (%50), siroz (%25), minimal değişiklikler (%16.6) ve portal fibrozis (%8.3) şeklinde idi.

Üçüncü grupta biyokimyasal, serolojik ve histopatolojik incelemeler sonucunda kronik B hepatiti tanısı alan 12 olgu vardı. Olguların tümünde 6 aydan uzun süredir devam eden HBsAg (+)'liği, Anti-HBc (+)'liği, HBeAg (+)'liği, HBV-DNA (+)'liği ve aktif karaciğer histopatolojisi (hepatik aktivasyon indeksi  $> 7$ ) saptandı. Serum ALT düzeyleri olguların dördünde (%33.3) 50-100 IU/l arasında, 7'sinde (%58.3) 100-200 IU/l arasında ve birinde (%8.3) 200 IU/l'nin üzerinde idi. Bunların 6'sı erkek, 6'sı kız olup yaşları 5-13 yıl yaş ortalamaları  $8.66 \pm 2.46$  arasında değişiyordu. Gruplar arasında hastaların yaşlarına göre anlamlı bir farklılık yoktu.

Perkütan karaciğer iğne biyopsisi ile alınan materyal Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma

Laboratuvarında hemen tartılıp, ardından 5 ml  $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4$  (3:1:1) (v:v) içinde yaş yakma tekniği ile yakıldı. Bu işlemin sonunda tüm örnekler 5 ml distile ve deionize edilmiş suyla sulandırıldı. Karaciğer dokusu Zn, Cu, Fe ve Mn konsantrasyonları Jobin Yvan spektrometresi kullanılarak ICP (Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometry)-AES aygıtında toplam 36 biyopsi örneğinde çalışıldı. Analitik dalga boyları Zn, Cu, Fe ve Mn için sırası ile 213.768 nm, 324.754 nm, 238.204 nm ve 280.106 nm idi (11). Eser element konsantrasyonları mikrogram/gram yaş karaciğer ağırlığı olarak verildi.

### İstatistiksel analiz

Gruplar arası eser element değerleri ve yaş dağılımları arasındaki farklılıklar Student "t" testi kullanılarak araştırıldı. Karaciğer dokusu Zn, Cu, Fe ve Mn konsantrasyonları arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon testi ile araştırıldı ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar (ortalama  $\pm$  SEM) olarak verildi.

### Sonuç ve Bulgular

Karaciğer biyopsi materyalinde eser element analizi yapılan 36 olguya ait sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Wilson hastalığı grubunda; karaciğer dokusu Cu konsantrasyonları normallerden oluşan kontrol grubuna ( $t=3.87$ ,  $p=0.001$ ) ve kronik hepatit B ( $t=3.31$ ,  $p=0.003$ ) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Wilson hastalığı grubundaki olguların karaciğer dokusu Zn, Fe ve Mn konsantrasyonları ise normal ve kronik hepatit B virus enfeksiyonlu çocukların karaciğer doku değerlerinden farklı bulunmadı. Kronik hepatit B virus enfeksiyonlu olgularda Cu, Zn, Fe ve Mn konsantrasyonları bakımından normal grupta yer alan çocuklara göre anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Çalışma gruplarında eser elementler arasında ilişkiler araştırıldığında normal olgulardan oluşturulan kontrol grubunda; Zn ile Mn ( $r=0.580$ ,  $p=0.048$ ) ve Cu ile Fe ( $r=0.671$ ,  $p=0.017$ ) arasında, Wilson hastalığı grubunda Zn ile Fe ( $r=0.671$ ,  $p=0.017$ ) ve Mn ile Fe ( $r=0.748$ ,  $p=0.005$ ) arasında, kronik hepatit B grubunda; Zn ile Mn ( $r=0.902$ ,  $p=0.0001$ ), Zn ile Fe ( $r=0.855$ ,  $p=0.002$ ), Cu ile Zn ( $r=0.867$ ,  $p=0.0001$ ), Cu ile Mn ( $r=0.874$ ,  $p=0.0001$ ) ve Cu ile Fe ( $r=0.697$ ,  $p=0.025$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar saptandı.

**Tablo 1.** Çalışma gruplarındaki karaciğer dokusu eser element konsantrasyonları (mikrogram/gram yaş ağırlık)\*

Eser Element	Normal Grup 1 (n= 12)	Wilson Hastalığı Grup 2 (n= 12)	Kronik Hepatit B Grup 3 (n= 12)
Zn	267.92 ± 46.29 (37.75-617.6)	170.56 ± 43.07 (54-510.9)	259.84 ± 40.31 (62.5-512.5)
Cu	17.19 ± 3.27a (5.42-40.74)	134.85 ± 30.16 (27.38-391.3)	28.06 ± 11.22b (6.37-150)
Mn	11.77 ± 2.44 (3.74-36.5)	8.77 ± 3.36 (0.82-43.5)	9.51 ± 1.45 (2.04-17.85)
Fe	659.06 ± 122.12 (106.2-1725)	726.37 ± 377.81 (79.1-4555)	550.6 ± 131.9 (61.5-1302)

\* Ortalama ± SEM (değişim sınırları)

a: p= 0.001, Wilson hastalığı ile kontrol grubu değerlerinin karşılaştırılması

b: p= 0.003, Wilson hastalığı ile kronik hepatit B grubu değerlerinin karşılaştırılması

## Tartışma

İnsan ve hayvan metabolizmasında Fe, Zn ve Cu gibi eser elementler arasında karşılıklı etkileşimlerin olduğu bilinmektedir. Örneğin diyetdeki Cu eksikliği Fe depolarının karaciğerden mobilizasyonunu hızlandırır, Cu fazlalığı ise Fe ve Zn'nun intestinal absorpsiyonunu inhibe eder (12, 13). Milman ve arkadaşları siroz olgularında karaciğerin Fe içeriğini normal, Cu içeriğini normalden yüksek bulmuşlar; alkolik sirozlularda ise karaciğerin Zn içeriğini azalmış, Mn içeriğini ise artmış olarak saptamışlardır (14). Ekstrahepatik biliyer atrezili çocuklarda yapılan bir çalışmada intrahepatik kolestaz sonucunda karaciğer Mn ve Cu düzeylerinde artış, Zn konsantrasyonunda ise azalma olduğu gösterilmiştir (9). Bizim çalışmamızda normal çocuklarda karaciğer dokusunda Cu ile Fe ve Zn ile Mn arasında pozitif korelasyon varken, Wilson hastalığı olanlarda Zn ile Fe ve Fe ile Mn arasında ve kronik B hepatitlilerde ise Zn ile Fe, Zn ile Mn ve Cu ile Fe arasında anlamlı pozitif korelasyonlar saptanmıştır.

Cu hem sentezi ve Fe absorpsiyonunun önemli bir katalizörü olan esansiyel bir eser elementtir. Cu fazlalığı ileri derecede toksik olup, hücre hasarı ile sonuçlanır (15). Wilson hastalığı kalıtsal bir Cu metabolizması bozukluğu olup hastalığın nedeni aşırı Cu'nun safra yolu ile atılamamasıdır (16). Schwabe ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada tedavi edilmemiş Wilson hastalarındaki karaciğer dokusu Cu düzeyleri primer biliyer siroz ve kronik aktif hepatit B olgularından daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak karaciğerde Cu depolanmasının Wilson hastalığı için tipik olduğu, ancak idiopatik hemokromatozis'te görülen ileri derecede artmış karaciğer demir depolarından daha az tanı koydurucu olduğu bildirilmektedir (17).

Çalışmamızda Wilson hastalığı grubunda normallere ve kronik B hepatitli olgulara oranla istatistiksel olarak daha yüksek karaciğer Cu konsantrasyonları saptanması, Wilson hastalığının patogenezi ile uyumludur. Wilson hastalığı ve kronik Cu depolanmasına neden olan patolojik durumların yoğun bir biçimde tanımlanmış olmasına karşın Cu ve diğer eser elementlerin karşılıklı etkileşimleri hakkında çok az bilgi vardır. Wilson hastalığındaki gibi anormal Cu birikimi, herediter hepatit ve spontan hepatosellüler karsinoma görülen mutant LEC (Long-Evans cinnamon) fareleri üzerinde yapılan çalışmalar hepatik Fe konsantrasyonunun yaşa bağlı olarak belirgin şekilde arttığını ortaya koymuştur. Hepatik Fe konsantrasyonundaki artış LEC farelerindeki karaciğer hasarında önemli bir ek faktör olabileceği sonucuna varılmıştır (18). Bizim Wilson hastalığı grubundaki olgularımızda, kontrol grubuna göre anlamlı bir Fe artışı söz konusu değildir.

Dimitrievich ve arkadaşları, histokimyasal yöntemlerle hepatositler içinde hemosiderin ve ferritin depo edildiğini göstererek, B hepatiti ile Fe metabolizması arasındaki ilişkiye dikkat çekmişlerdir (19). Çalışmamızda kronik hepatit B grubunda yer alan hastalarımız kontrol grubu ile kıyaslandığında Fe konsantrasyonlarında anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır.

Zn pekçok fizyolojik mekanizmaya katılan, daha çok intrasellüler, esansiyel bir eser elementtir. Zn çoğunlukla bir antioksidan gibi işlev görür ve hücre membranlarını stabilize eder. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda Zn tedavisinin metallothionein indüksiyonu sayesinde asetaminofene bağlı hepatotoksisiteyi azalttığı gösterilmiş olup, bu durumun metallothionein'lerin antioksidan rolleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (20). HBsAg pozitif

ve normalden 10 kat daha fazla metallothionein sentezi yapabilen transgenik farelerde üzerinde yapılan çalışmalar metallothionein-I'in hepatit B virusuna bağlı karaciğer zedelenmesine karşı yararlı etkileri olduğunu göstermiştir (21). Tayland'ta %85'i kronik B hepatitlilerin oluşturduğu hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada serum Zn düzeylerinin kronik aktif hepatitli ve sirozlu olgularda anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır (22). Gür ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kronik B hepatitinde karaciğer hasarı arttıkça, karaciğer Zn konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (23). Bizim kronik hepatit B grubumuzda normallere göre karaciğer dokusu Zn konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Bilindiği gibi serbest oksijen radikalleri, bazı patolojik olaylarda görülen hücre harabiyetlerinin ortaya çıkmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar Mn'nin oksidatif hasara karşı koruyucu bir esansiyel element olduğunu ortaya koymuştur. Mn, süperoksid ve hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmaktadır (24). Al Bader ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada deneysel olarak siroz oluşturulan farelerde karaciğer Mn düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüş olup, Mn'nin dokuların antioksidan aktivitesini koruyarak hücre yapısının stabilize edilmesinde önemli bir rol oynadığına işaret edilmiştir (6). Bizim Wilson hastalığı ve kronik B hepatit gruplarımızda kontrol grubuna göre anlamlı bir Mn düşüklüğü yoktur.

Bu sonuçlar; Wilson hastalığında normallere ve kronik hepatit B hepatitlilere göre anlamlı şekilde yüksek karaciğer dokusu Cu birikimi olduğunu ve fonksiyonel karaciğer bozukluğuna neden olan Wilson hastalığı gibi metabolik ve kronik B hepatiti gibi viral hastalıklarda karaciğer dokusu eser element konsantrasyonları arasında normalden farklı bazı ilişkilerin ortaya çıktığını düşündürmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Suzuki K, Oyama R, Hayashi E, Arakawa Y. Liver diseases and essential trace elements. *Nippon Rinsho* 1996; 54: 85-92.
2. Kollmeier H, Seemann J, Wittig P, Rothe G, Witting C. Zinc concentrations in human tissues. Liver zinc in carcinoma and severe liver disease. *Pathol Res Pract* 1992; 188: 942-5.
3. David M Banks. Inborn error of trace element metabolism. *Clin Endc Metabol* 1985; 14: 591-615.
4. Steinhardt M, Bunger U, Gratsch U, Langanke M, Gollnast I. Trace elements in the liver and myocardium of stillborn dairy calves. *Tierarztl Prax* 1993; 21: 13-7.
5. Suzuki KT, Kanno S, Misawa S, Aoki Y. Copper metabolism leading to and following acute hepatitis in LEC rats. *Toxicology* 1995; 97: 81-92.
6. Al Bader AA, Mosawi MH, Hussain TA, Dashti HM. Effect of dietary selenium, zinc and allopurinol supplements on plasma and tissue manganese levels in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Mol Cell Biochem* 1997; 173: 121-5.
7. Dashti HM, Mathew TC, Jadaon MM, Ashkanani E. Zinc and liver cirrhosis: biochemical and histopathologic assessment. *Nutrition* 1997; 13: 206-12.
8. Nagasue N, Kolno H, Chang YC, Nakamura T. Iron, copper and zinc levels in serum and cirrhotic liver of patients with and without hepatocellular carcinoma. *Oncology* 1989; 46: 293-6.
9. Bayliss EA, Hambidge KM, Sokol RJ, Stewart B, Lilly JR. Hepatic concentrations of zinc, copper and manganese in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Trace Elem Med Biol* 1995; 9: 40-3.
10. Dashti HM, al Sayer H, Behbehani A, Madda J, Christenson JT. Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xanthine oxidase inhibitor treatment. *J R Coll Surg Edinb* 1992; 37: 23-8.
11. Kneip TJ, Crable JV. *Methods for Biological Monitoring*. Washington DC: American Public Health Association, 1988; 118: 223-8.
12. Brzozowska A. Interaction of iron, zinc and copper in the body of animals and humans. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1989; 40: 302-12.
13. Whittaker P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(2 Suppl): 442-6.
14. Milman N, Laursen J, Podenphant J, Asnaes S. Trace elements in normal and cirrhotic human liver tissue. I. Iron, copper, zinc, selenium, manganese, titanium and lead measured by X-ray fluorescence spectrometry. *Liver* 1986; 6: 111-7.
15. Barceloux DG. Copper. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; 37: 217-230.
16. Brewer GJ, Yuzbasiyan Gurkan V. Wilson disease. *Medicine* Baltimore 1992; 71: 139-64.
17. Schwabe U, Friedrich K. Significance of the iron and copper content of the liver for the differential diagnosis of chronic liver diseases. *Z Gastroenterol* 1990; 28: 353-7.
18. Kato J, Kohgo Y, Sugawara N, Katsuki S, Shintani N, Fujikawa K et al. Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 219-22.
19. Dimitrijevic J, Bojanic N, Skaro Milic A, Mijuskovic P, Ilic S, Nozic D. Morphologic characteristics of HBV markers and products of iron metabolism in liver tissue in patients with hepatitis B virus. *Vojnosanit Pregl* 1992; 49: 477-8.
20. Liu J, Liu Y, Hartley D, Klaassen CD, Shehin-Johnson SE, Lucas A et al. Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Pharma-col Exp Ther* 1999; 289: 580-6.
21. Quaipe CJ, Cherne RL, Newcomb TG, Kapur RP, Palmiter RD. Metallothionein overexpression suppresses hepatic hyperplasia induced by hepatitis B surface antigen. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 155: 107-16.
22. Pramoolsinsap C, Promvanit N, Komindr S, Lerdverasirikul P, Sriuanujata S. Serum trace metals in chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma in Thailand. *J Gastroenterol* 1994; 29: 610-5.
23. Gür G, Bayraktar Y, Özer D, Özdoğan M, Kayhan B. Determination of hepatic zinc content in chronic liver disease due to hepatitis B virus. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 472-6.
24. Hussain S, Ali SF. Manganese scavenges superoxide and hydroxyl radicals: an in vitro study in rats. *Neurosci Lett* 1999; 261: 21-4.

