

Kronik HBV ve HCV Hastalarında Otoantikor Prevalansı

THE PREVALANCE OF AUTOANTIBODIES IN CHRONIC HBV AND HCV PATIENTS

Dr. İlhan AFŞAR,^a Dr. Aslı Gamze ŞENER,^a Dr. Nükhet KURULTAY,^a Dr. Metin TÜRKER^a

^aMikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İZMİR

Özet

Amaç: Kronik HBV ve HCV hastalarında anti-nükleer antikor, anti-mitokondriyal antikor, anti-düz kas antikor, anti-karaciğer-böbrek mikrozom antikor pozitifliğini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: HBs Ag ve HBV DNA'sı (+) pozitif saptanan 102 kronik HBV hastası ile anti HCV ve HCV RNA'sı (+) pozitif saptanan 98 kronik HCV hastası çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak; Hbs Ag ve anti HCV negatif 90 serum çalışmaya alındı. HBs Ag ve anti HCV kemilüminesan tekniği ile VITROS (Ortho-Clinical Diagnostics) ile çalışıldı. HBV DNA ve HCV RNA düzeyleri kantitatif olarak gerçek zamanlı (Real Time) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile ölçüldü. Otoantikorlar (ANA, AMA, ASMA, ALKM) indirekt floresan antikor tekniği ile çalışıldı. İstatistiksel işlemlerde ki-kare testi uygulandı. İstatistiksel analizler SPSS (for Windows 10.0) programı ile yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızda kronik HCV enfeksiyonlu 98 hastanın 28 (%28.5)'inde otoantikor pozitif olarak saptandı. Kronik HBV enfeksiyonlu toplam 102 hastanın 30 (%29.4)'unda otoantikor saptandı. Her iki grupta da ANA en fazla saptanan otoantikor tiydi (HBV hastalarında %66.6 ANA, %12.6 ASMA, ve HCV hastalarında %65.3 ANA, %3 AMA, %7 ASMA %1 ALKM). Kontrol grubunun 13 (%14.4)'ünde otoantikor saptandı. Diğer otoantikorların sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç: Bu çalışma; kronik HBV ve HCV enfeksiyonlu hastalarda otoantikorların sık olduğunu ve kronik karaciğer enfeksiyonlarında araştırılması gerekliliğini gösterdi.

Abstract

Objective: To investigate the presence of anti nuclear antibody (ANA), anti mitochondrial antibody (AMA), anti smooth muscle antibody (ASMA) and liver kidney microsomal antibody (ALKM) in patients with chronic HBV and HCV infections.

Material and Methods: One hundred and two chronic HBV patients positive for HBs Ag and HBV DNA and 98 chronic HCV patients positive for anti-HCV antibody and HCV RNA were included in the study. Ninety serum samples negative for HBs Ag and anti-HCV comprised the control group. Chemiluminescence technique, VITROS (Ortho-Clinical Diagnostics) was used to determine HBs Ag and anti-HCV. The levels of HBV DNA and HCV RNA were determined quantitatively by real time polymerase chain reaction. Indirect immunofluorescence antibody technique was used for autoantibody (ANA, AMA, ASMA, ALKM) detection in the patient and control groups. Data were analyzed using the statistical package for social science software, version 10.0 and the prevalence in patient and control groups were compared using the chi-square test.

Results: Of the 102 patients with chronic HBV infection and of the 98 patients with chronic HCV infection, 30 (29.4%) and 28 (28.5%) were positive for autoantibodies, respectively. ANA was the most common antibody in both patient groups (66.6% ANA, 12.6% ASMA in HBV patients and 65.3% ANA, 3% AMA, 7% ASMA, 1% ALKM in HCV patients). Autoantibodies were positive in 13 (14.4%) of the 90 control serum samples. The results of the other autoantibodies were not statistically significant.

Conclusion: This study indicates that autoantibodies are more prevalent among patients with chronic HBV and HCV infections and they should be investigated in chronic liver infections.

Key Words: Hepatitis B; hepatitis C; autoantibody

Anahtar Kelimeler: Hepatit B; hepatit C; otoantikor

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27:649-653

Geliş Tarihi/Received: 25.01.2007 **Kabul Tarihi/Accepted:** 20.03.2007

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. İlhan AFŞAR
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
İZMİR
iafsar@yahoo.com

Copyright © 2007 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27

Kronik hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) dünya çapında önemli viral enfeksiyonlardır. Akut ya da kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler kansere (HCC) sebep olabilir. Çeşitli çalışmalar kronik HBV ve HCV'nin otoimmün romatolojik hastalık-

ların oluşum mekanizmalarını tetiklediğini ve her iki durumda da dolaşımdaki immünkomplekslerin depolanmasında artış olduğunu bildirmişlerdir.¹ Karaciğer hastalıklarındaki virüsün tetiklediği otoreaktivite tek bir genel kavram olarak açıklanamamıştır. Olayın mekanizması üzerine yapılan çalışmalar ve kaçınılmaz doku hasarı günümüzde tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Otoimmün hastalıklar kendi antijenlerine toleransın azalması, otoreaktif lenfositlerin aktivasyonu ve tek bir organ ya da birçok organda hasar oluşumu ile karşımıza çıkar.² Çeşitli hepatotropik virüslerin direkt olarak sitopatik etki yapmadığı, virüs enfekte hücrelere karşı konak immün yanıtın oluştuğu ya da birlikte olabilecek diğer bir virüs enfeksiyonu sonucu hepatositlere karşı otoreaksiyonun olabileceği tezi vardır.³ Otoantikorlar HBV'ye bağlı HCC ve kronik HBV'de interferon sağaltımı sonrası da ortaya çıkabilir.^{4,5}

Çalışmamızın amacı; kronik HBV ve HCV hastalarında anti-nükleer antikor (ANA), anti-mitokondriyal antikor (AMA), anti-düz kas antikor (ASMA), anti-karaciğer-böbrek mikrozom antikor (ALKM) pozitifliğini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler

HBs Ag ve HBV DNA'sı (+) pozitif saptanan 102 kronik HBV hastası ile anti HCV ve HCV RNA'sı (+) pozitif saptanan 98 kronik HCV hastası çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak; Hbs Ag ve anti HCV negatif 90 serum çalışmaya alındı. HBV DNA ve HCV RNA çalışılan hasta serumları ile kontrol serumları otoantikor çalışılınca kadar -80°C'de saklandı. Otoantikorlar aynı gün hazırlanıp değerlendirildi.

HBs Ag ve anti HCV kemilüminesan tekniği ile VITROS (Ortho-Clinical Diagnostics) ile çalışıldı.

HBV DNA ve HCV RNA düzeyleri kantitatif (10^8 - 10^3 genom/mL) olarak gerçek zamanlı PCR tekniği ile ölçüldü. Kısaca; nükleik asit eldesi için hasta serumlarından 200 µL örnek RoboGene® Quantification kit (Roboscreen, Germany) kullanılarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. HBV DNA'nın saptanması için 20 µL (miks, primer ve taqMan prob) (Roboscreen,

Germany) ve 5 µL ekstraksiyon ürünü karışımı ABI prism 7700 (Applied, Biosystems, Foster City, CA) ile çalışıldı.

Otoantikorlar indirekt floresan antikor tekniği ile 1/100 dilüsyonda; ANA, AMA, ASMA için (Mosaic Basic Profile 3A/Euroimmün) kiti ile ALKM için (Liver Mosaic 1/Euroimmün) ile çalışılarak değerlendirilmeye alındı. Değerlendirme üretici firma önerileri doğrultusunda (+, ++, +++) skorlaması yapıldı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel işlemlerde ki-kare testi uygulandı. İstatistiksel analizler SPSS (for Windows 10.0) programı ile yapıldı.

Bulgular

Kronik HBV taşıyıcısı 102 hastanın 30'unda otoantikor saptandı. Üç hastada hem ANA hem de ASMA pozitifliğine rastlandı. Hastalarımızda en fazla ANA pozitifliği bulundu. Hastalarda AMA ya da ALKM pozitifliğine rastlanmadı. HBV hastaları ve kontrol grubunun sonuçları ile istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kronik HCV taşıyıcısı 98 hastanın 26'sında otoantikor saptandı. Bir hastada ANA ve AMA bir hastada ANA ve ASMA pozitifliği saptandı. Hastalarda en çok ANA pozitifliği saptandı. ALKM bir hastada ve (+++) güçlü pozitif olarak saptandı. HCV hastaları ve kontrol grubunun sonuçları ile istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Kontrol grubunun 13'ünde otoantikor saptandı. Beşinde ANA 5'inde ASMA ve 3'ünde AMA pozitifliği saptanırken ALKM pozitifliği saptanmadı.

Tablo 1. Kronik HBV taşıyıcısı hastalar (n= 102) ile kontrol grubunda saptanan otoantikor dağılımı.

	ANA	AMA	ASMA	ALKM
+	11 (4)	0 (1)	10 (4)	0
++	8 (1)	0 (2)	3 (1)	0
+++	1	0	0	0
Toplam	20 (5)	0 (3)	13 (5)	0
p	p< 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p> 0.05

Not: Parantez içindeki sayılar kontrol grubuna (n= 90) aittir.

Tablo 2. Kronik HCV taşıyıcısı hastalar (n= 98) ile kontrol grubunda saptanan otoantikör dağılımı.

	ANA	AMA	ASMA	ALKM
+	10 (4)	1 (1)	6 (4)	0
++	4 (1)	2 (2)	0 (1)	0
+++	3	0	1	1
Toplam	17 (5)	3 (3)	7 (5)	1
p	p< 0.05	p> 0.05	p> 0.05	p> 0.05

Not: Parantez içindeki sayılar kontrol grubuna (n= 90) aittir.

Kronik HCV ve HBV taşıyıcılarının kontrol grubuna göre karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıktı ($p < 0.05$).

Tek başına otoantikör tiplerine göre istatistiksel analiz yapıldığında yalnızca ANA açısından anlamlılık ortaya çıktı ($p < 0.05$). Diğer otoantikör tiplerinde istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Her iki grup (HCV ve HBV taşıyıcıları açısından) birbirlerine göre istatistiksel bir farklılık göstermedi ($p > 0.05$).

Tartışma

Otoreaktivite karaciğer hastalıklarında karşımıza sık çıkar. Etiyolojik olarak özellikle ilaç ve kimyasallara bağlı daha sık olarak da enfeksiyonda görülür. Enfeksiyonlar içinde ise HCV en sık etken olarak görülür.⁶

Virüsün indüklediği otoimmünitenin mekanizma teorileri 3 kategoride incelenmektedir. Bunlar otoantijen değişimi, konakçı immün yanıtı bozukluğunun otoantikör üretiminin kontrolündeki bozukluğa neden olması ve moleküler taklitçilik (mimicry) olarak sayılabilir.³ Uygunsuz olarak viral antijenlere karşı konak immün yanıtının ortaya çıkması virüsün antijenleri ile konak hücre komponentlerinin benzerliği sonucu ortaya çıkabilir ve bu olaya 'moleküler mimicry' antijenik taklit denmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada; HBV-DNA polimerase'ın 7-9 aminoasit dizisinin nükleer (MHC II trans-aktivator, nükleer pore core protein, nükleer mitotik aparat ve polmyositis sclerosus antijeni) ve düz kas proteinlerinden Caldesmon ve miyozin proteinlerine benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır.⁷

HCV viral hepatitin yaygın nedenidir ve hastaların çoğu kronikleşir. Hastalık klinik olarak asemptomatik olmasına karşın siroz, hepatosellüler karsinom, kryoglobulinemi, otoantikörler ve glomerülonefrit HCV ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.⁸ HCV enfeksiyonlu hastalarda organ spesifik veya spesifik olmayan antikörler saptanmıştır. ASMA düz kas hücrelerine karşı reaksiyona girer ve kronik HCV enfeksiyonlarında %10-66 oranında saptanmıştır. ANA %6-22 oranında ve düşük titrelerde (1/40-1/80) saptanmıştır. "ALKM hepatositlerin stoplazmasında ve proksimal renal tübülerde bulunur. LKM antikörleri sitokrom p450'nin değişik epitoplara karşı oluşur. LKM antikörleri kronik HCV'li hastalarda düşük titrelerde olmak üzere %10'a kadar saptanabilir.⁶ Daha önceki çalışmaların çoğu serum otoantikörleri saptanan ya da saptanmayan kronik HCV'li hastaların klinik ve biyokimyasal parametrelerinde anlamlı bir farkın oluşmadığını bildirmiştir.^{9,10}

Çalışmamızda kronik HCV enfeksiyonlu 98 hastanın 28 (%28.5)'inde otoantikör pozitif olarak saptandı. Kronik HBV enfeksiyonlu toplam 102 hastanın 30 (%29.4)'unda otoantikör saptandı. Her iki grupta da ANA en fazla saptanan otoantikör tipi idi. Kontrol grubunun 13 (%14.4)'ünde otoantikör saptandı.

HCV'ye bağlı ortaya çıkan otoantikörlerin tespiti daha önceki çalışmalarda yapılmış ve bildirilmiştir. Estonya'da yapılan çalışmada HCV ile enfekte 90 hastada 1/100 dilüsyonda 1 hastada ANA pozitifliği ve 5 hastada ASMA pozitifliği saptanmıştır.⁶ Diğer bir çalışmada 69 kronik HCV'li hastanın 11'inde ANA, 7'sinde ASMA, bir hastada AMA ve ALKM antikörleri pozitif saptanmıştır.¹¹

Agarwal ve ark.nın yaptığı çalışmada 25 HCV'li hastanın %32'sinde ALKM, %24'ünde ASMA, %12'sinde ANA pozitifliği görülürken hiçbir hastada AMA pozitifliği saptanmamıştır.¹²

Romatolojik semptom ve otoimmün göstergeler HCV enfeksiyonu ile beraber olabilir ve genellikle HCV gözden kaçabilir. Açıklanamayan eklem ağrısı ve/veya palpabl purpuralı hastalarda HCV enfeksiyonu düşünülmelidir. Bu düşünceyle sık rastlanan romatolojik bir hastalık olan sistemik lupus eritema-

tosuslu (SLE) 91 hastanın %6.6'sında HCV saptanırken kontrol grubunun %1.39'unda HCV pozitif saptanmış ve anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır.¹³

Kronik HBV'li hastalarda yapılan daha önceki çalışmalarda %27.1 ANA ve %25.7 ASMA pozitifliği saptanmıştır.³ HBV taşıyıcısı primer hepatosellüler karsinomlu 102 hastanın 26'sında otoantikör saptanırken bunlardan 23'ünde ANA, 2'sinde ASMA 1'inde ALKM pozitifliği saptanmıştır.⁴ Diğer bir çalışmada kronik HBV'li çocuklarda interferonun otoantikör oluşumu üzerine etkisi araştırılmış ve sağaltım öncesi 61 hastanın 10'unda otoantikör saptanırken interferon sağaltımı sonrası 33 hastada otoantikör oluşumu saptanmış ve istatistiksel olarak ASMA oluşumu anlamlı bulunmuştur.⁵ Lenzi ve ark. yaptığı diğer bir çalışmada ise; 87 Hbs Ag taşıyıcısı hastanın %7'sinde otoantikör saptanırken en fazla ASMA pozitifliğine rastlanmıştır.¹⁴ Dudek ve ark.nın Polonya'da yaptığı çalışmada toplam kronik hepatitli 80 hastada artritte görülen serolojik göstergeleri ve otoantikörleri araştırmışlar, %75 hastada en az bir göstergelyi saptamışlar; kronik HCV hastalarında daha fazla saptanırken aminotransferaz aktivitesi ile göstergeler arasında anlamlı bir sonuç bulamamışlardır.¹⁵

Çalışmamızda otoantikör araştırırken 1/100 sulandırımıyla başlandı. Diğer çalışmalarda daha düşük sulandırımalarla başlanmasına karşın sağlıklı popülasyonda düşük düzeyde otoantikör taşıyıcılığı olabileceğinden üretici firma önerileri doğrultusunda 1/100 sulandırımı baz aldık. Rutin olarak poliklinik hastalarının otoantikör araştırmalarında düşük düzeyde (borderline) otoantikör pozitifliğine rastlamaktayız. Bu tip sonuçlar klinisyenleri de romatolojik hastalıklardan uzaklaştırmaktadır ve 2-3 yıldır hastanemizde yoğun kullanımda olan otoantikörlerle ilgili olarak klinisyenler de bizim düşüncelerimize katılmaktadır. Hastalarımızın tanı almış ve takipte olması nedeniyle interferon sağaltımı almaları ve otoantikör oluşumunu tetikleyebileceği göz önünde bulundurulması gereken diğer önemli bir konudur. Kronik KC hastalığında interferon sağaltımı sonucu transferaz aktivite artışı olduğunda hepatotropik diğer bir virüs, toksik hepatit, viral süper enfeksiyon ve metabolik hastalık dışlandığında otoantikör oluşumu akla gelmelidir.

İnterferon sağaltımı öncesi HLA tiplendirmesinde A1 B8 DR3 spesifik profili bulunduğu, alfa interferon sağaltımına bağlı ANA ve ASMA oluşumuna sık rastlandığı gösterilmiştir.¹⁶

Çalışmamızda kronik HCV ve HBV taşıyıcılarının kontrol grubuna göre karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıktı ($p < 0.05$). Tek başına otoantikör tiplerine göre istatistiksel analiz yapıldığında yalnızca ANA açısından anlamlılık ortaya çıktı ($p < 0.05$). Diğer otoantikör tiplerinde istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ($p > 0.05$). Her iki grup (HCV ve HBV taşıyıcıları açısından) birbirlerine göre istatistiksel bir farklılık göstermedi ($p > 0.05$).

Sonuç olarak; romatolojik semptom ve otoimmün göstergeler HCV ve HBV hastalarında sıklıkla karşılaşılabılır, açıklanamayan romatolojik bulgular olduğunda viral hepatit etkenleri düşünülmelidir. Aynı zamanda kronik HCV ve HBV hastalarında otoantikör oluşabileceği unutulmamalıdır. Özellikle kronik viral karaciğer hastalığında interferon sağaltımının otoantikör oluşumunu tetikleyeceğinin düşünülmesi gerekir. Otoantikörlerin varlığını araştırmak sağaltım yönünü belirlemede önem taşır. İnterferon sağaltımı otoimmün hepatiti tetiklerken, kortikosteroid sağaltımı viral replikasyonu artırır. Sağaltım önceliğinin predominant hastalığa odaklanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Michalska Z, Stalke P, Witczak-Malinowska K, Lakomy EA, Sikorska K, et al. Autoimmune reactions in HBV and HCV. *Med Sci Monit* 2001;7(Suppl 1):175-80.
2. Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, Racanelli V, D'Amore FP, Lauletta G. The lymphoid system in hepatitis C virus infection: Autoimmunity, mixed cryoglobulinemia, and Overt B-cell malignancy. *Semin Liver Dis* 2000;20:143-57.
3. Shantha S, Thyagarajan SP, Premavathy RK, Sukumar RG, Mohan KV, Palanisamy KR, et al. Correlation of autoimmune reactivity with hepatitis B and C virus (HBV and HCV) infection in histologically proven chronic liver diseases. *Indian J Med Microbiol* 2002;20:12-5.
4. Fang F, Wang HL, Ye P, Deng HL, Dong GL, Ma LL, et al. Detection of autoantibodies in the serum of primary hepatocarcinoma patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:94-5.
5. Kansu A, Kuloglu Z, Demircen F, Girgin N. Autoantibodies in children with chronic hepatitis B infection and the influence of interferon alpha. *Turk J Gastroenterol* 2004;15:213-8.

6. Zusinaite E, Metskula K, Salupere R. Autoantibodies and hepatitis C virus genotypes in chronic hepatitis C patients in Estonia. *World J Gastroenterol* 2005;11:488-91.
7. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Vegnente A, Mieli-Vergani G, Vergani D. Mimicry between the hepatitis B virus DNA polymerase and the antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1999;162:1802-10.
8. Dickson RC. Clinical manifestations of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997;1:569-85.
9. Luo JC, Hwang SJ, Li CP, Lu RH, Chan CY, Wu JC, et al. Clinical significance of serum auto-antibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C: Negative role of serum viral titre and genotype. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:475-9.
10. Zein NN, Persing DH, Czaja AJ. Viral genotypes as determinants of autoimmune expression in chronic hepatitis C. *Mayo Clin Proc* 1999;74:454-60.
11. Wu CH, Xu XY, Tian GS, Yu YY. Serum autoantibodies of patients with chronic hepatitis C and the significance thereof in infection of hepatitis C virus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86:390-3.
12. Agarwal N, Handa R, Acharya SK, Wali JP, Dinda AK, Aggarwal P. A study of autoimmune markers in hepatitis C infection. *Indian J Med Res* 2001;113:170-4.
13. Costa Cde A, Papi JA, Coelho HS, Nogueira C, Vanderboght B, Soares JA. Prevalence of hepatitis C in patients with systemic lupus erythematosus in the Hospital of Federal University of Rio de Janeiro (HUCCF). *Rev Assoc Med Bras* 2002;48:42-7.
14. Lenzi M, Bellentani S, Saccoccio G, Muratori P, Masutti F, Muratori L, et al. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: A nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999;45:435-41.
15. Dudek A, Dudziak M, Sulek M, Thustochowicz W. Serological markers of arthritis in patients with chronic viral hepatitis. *Pol Merkur Lekarski* 2006;20:404-7.
16. Rocca P, Codes L, Chevallier M, Trépo C, Zoulim F. Auto-immunization induced by interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:1173-6.