PRZEGL EPIDEMIOL 2001;55:459-64

Joanna Jabłońska, Jakub Ząbek, Joanna Kozłowska, Janusz Cianciara*

ZABURZENIA IMMUNOLOGICZNE U CHORYCH Z PRZEWLEKŁYM WIRUSOWYM ZAPALENIEM WĄTROBY TYPU C

Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych AM w Warszawie
Kierownik Kliniki: J. Cianciara
* Zakład Serologii i Mikrobiologii Instytutu Reumatologicznego
Kierownik Zakładu: J. Ząbek

Zbadano 93 chorych przewlekle zakażonych HCV, oceniając występowanie zaburzeń immunologicznych (krioglobuliny, autoprzeciwciała, krążące kompleksy immunologiczne, czynnik reumatoidalny) i występowanie objawów pozawątrobowych. U większości chorych zaburzenia te były obecne. Objawy kliniczne zwykle nie miały dużego nasilenia.

WSTĘP

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) prowadzi do zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego gospodarza na drodze różnych mechanizmów (1, 2, 3). Udowodniono występowanie materiału genetycznego i replikację HCV w mononuklearach krwi obwodowej i innych komórkach układu białokrwinkowego np. limfocytach B oraz komórkach szpiku (4, 5, 6, 7, 8, 9). Niektórzy badacze sugerują, że białka wirusa mogą wiązać cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC), uniemożliwiając pobudzenie receptorów limfocytów T oraz lizę zakażonych hepatocytów przez komórki uczulone na HCV (1). W surowicy u części pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C można wykryć obecność przeciwciał przeciwtkankowych. Częściej niż w pozostałej populacji występują u nich towarzyszące choroby z autoagresji (10). Nie stwierdzono zależności pomiędzy genotypem HCV a indukcją zjawisk autoimmunologicznych (11) co sugeruje, że ich ekspresja zależy raczej od czynników związanych z gospodarzem.

U chorych zakażonych HCV jednym z najczęściej występujących nieprawidłowych zjawisk immunologicznych jest krioglobulinemia - we krwi obecne są immunoglobuliny precypitujące w chłodzie i ponownie rozpuszczające się po podgrzaniu. Mieszana krioglobulinemia jest określana jako wtórna, jeżeli towarzyszy przewlekłym stanom zapalnym (nie powodowanym przez wirusy) lub chorobom autoimmunologicznym i rozrostowym układu chłonnego. W przypadkach, w których nie można znaleźć pierwotnej przyczyny, krioglobulinemia określana jest jako samoistna. Objawy kliniczne krioglobulinemii związane są z zapaleniem drobnych naczyń, które jest indukowane przez złogi krioglobulin w ich ściankach. Są to zwykle zaburzenia układowe manifestujące

się jako: plamica, osłabienie, bóle stawów, polineuropatia obwodowa, niekiedy uszkodzenie nerek przebiegające z proteinurią i zespołem nerczycowym. W ostatnim dziesięcioleciu stwierdzono, że u większości osób z krioglobulinemią można znaleźć markery zakażenia HCV. Nie można także wykluczyć, że HCV, jako wirus częściowo limfotropowy, może powodować choroby rozrostowe układu chłonnego. Opisywano przypadki chłoniaka złośliwego wywodzącego się z limfocytów B, w których u części pacjentów wykryto obecność HCV RNA w zmienionych nowotworowo komórkach szpiku i węzłów chłonnych (5). U niektórych pacjentów zakażonych wirusem C zapalenia wątroby rozwija się uszkodzenie nerek, zwłaszcza błoniaste (12, 13) i błoniasto-rozplemowe (14) kłębkowe zapalenie. Mogą to być stany towarzyszące krioglobulinemii, lub od niej niezależne (15, 16). Celem niniejszej pracy była ocena występowania nieprawidłowych zjawisk immunologicznych u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. W tym celu badano występowanie krioglobulin, autoprzeciwciał (przeciwjądrowych - ANA, przeciw mięśniom gładkim - SMA i przeciwmitochondrialnych - MIT), czynnika reumatoidalnego, kompleksemii oraz oraz oceniano kliniczne manifestacje pozawątrobowe - bóle stawów, zmiany skórne, zespół suchości błon śluzowych itp.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono u 93 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C (n=75) i pozapalną marskością wątroby typu C (n= 18). Badani byli pacjentami Kliniki Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych w Warszawie w latach 1996-2000. Było wśród nich 51 mężczyzn (55%) i 42 kobiety (45%). Średni wiek pacjentów wynosił 48 lat (20-70 lat).

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C stwierdzano na podstawie wywiadu - trwającego co najmniej 6 miesięcy podwyższenia wartości aminotransferaz, wykrycia przeciwciał anty-HCV testami immenoenzymatycznymi III generacji oraz znalezienia w surowicy HCV RNA metodą RT-PCR *(reverse transcription polymerase chain reaction)*. Z badania wykluczono osoby zakażone dodatkowo HBV i nadużywające alkoholu.

U 76 pacjentów wykonano biopsję wątroby. W badaniu patomorfologicznym stwierdzono u 9 osób *hepatitis chronica minimalis,* u 49 *hepatitis chronica suavis,* u 8 *hepatitis chronica moderata* i u 10 *hepatitis chronica gravis*. U 14 osób stwierdzono kliniczne cechy niewyrównanej marskości wątroby: obniżenie poziomu albumin i osoczowych czynników krzepnięcia, wodobrzusze i obrzęki obwodowe, żylaki przełyku, okresowo - cechy encefalopatii.

Krioglobuliny wykrywano w oparciu o ich zdolność do odwracalnej precypitacji po trwającej 4-6 dni inkubacji w temp. +4°C . Typ krioglobulinemii badano w podwójnej dyfuzji przy użyciu surowic króliczych przeciwko ludzkim immunoglobulinom klasy Ig A, IgG i IgM. Monoklonalnych immunoglobulin poszukiwano metodą elektroforezy na agarze. Obecność czynników reumatoidalnych w krioprecypitatach i surowicach oznaczano przy użyciu komercyjnych testów immunoenzymatycznych. Autoprzeciwciała ANA, SMA i anty LKM oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej. Kompleksy immunologiczne badano metodą immunoelektroforezy osadów wytrącanych z badanych surowic PEG 6000. Analizę statystyczną zależności między zmiennymi

przeprowadzono przy pomocy testu Chi-kwadrat oraz dokładnego testu Fishera. Występowanie pozawątrobowych manifestacji zakażenia HCV oceniano na podstawie wywiadu i badania przedmiotowego.

WYNIKI

W badanej grupie 93 pacjentów zakażonych HCV u 35 osób (38%) stwierdzono występowanie krioglobuhnemii (tab. I). Wśród tych osób było 16 mężczyzn (46%) i 19 kobiet (54%). U 3 pacjentów (3%) stwierdzono krioglobulinemię typu II, a u 90 - typu III (97%). Obecność kompleksów immunologicznych wykazano u 87 osób (93,5%) (metodą immunoelektroforezy osadów wytrąconych glikolem poletylenowym - PEG 6000). Czynnik reumatoidalny (RF - rheumatoid factor) w co najmniej jednej z klas immunoglobulin wykryto u 38 osób (41%). RF IgA stwierdzano u jedenastu osób (w tym 4 z krioglobulinemią), zaś RF IgG u siedmiu (wszystkie bez krioglobuhnemii). Czynnik reumatoidalny w klasie IgA częściej występował u osób z większą sumą punktów opisujących aktywność zapalną i nasilenie włóknienia w badaniu histologicznym wątroby ($p < 0,05$). U 15 osób (16%) stwierdzono obecność przeciwciał przeciwjądrowych (ANA). U wszystkich typ świecenia był homogenny. Tylko dwie osoby, obie z krioglobulinemią, miały miano przeciwciał wynoszące 1:160, u pozostałych miano przeciwciał wynosiło 1:40.

U 21 osób (23%) stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwko mięśniom gładkim (SMA) - tylko u jednej miano wynosiło 1:160. Obecność tych autoprzeciwciał w sposób statystycznie znamienny ($p < 0,025$) korelowała z nasileniem aktywności zapalnej wątroby *(grading)* w badaniu histopatologicznym.

U 5 osób (5%) stwierdzono występowanie przeciwciał anty-LKMl. Miana przeciwciał nie przekraczały 1:40. U 56 osób (60%) wykryto obecność przynajmniej jednego spośród badanych autoprzeciwciał (ANA, SMA oraz anty-LKMl). Nie było związku między występowaniem krioglobulin, RF i kompleksów immunologicznych a nasileniem zmian histologicznych w wątrobie, a także nie było różnic w częstości ich występowania pomiędzy chorymi z marskością wątroby i bez niej.

Spośród 35 osób z krioglobulinemią 15 (43%) skarżyło się na bóle stawów. Podobne dolegliwości zgłaszało sześć osób bez krioglobuhnemii (10%). Żaden z pacjentów nie miał cech zapalenia stawów: obrzęków, zaczerwienienia, nadmiernego ucieplenia ani miejscowej palpacyjnej bolesności stawów. Dolegliwości bólowe miały zmienne nasilenie i lokalizację.

U sześciu pacjentów (13%) stwierdzano zmiany skórne o typie vasculitis. U trzech z nich była to plamica na kończynach dolnych, zwłaszcza podudziach, przejściowo pojawiająca się na okres kilku-kilkunastu dni. U jednej chorej stwierdzono występowanie rumienia stwardniającego na kończynach dolnych. U jednej pacjentki zmiany dotyczyły skóry dłoni i stóp. U trzech osób stwierdzono występowanie porfirii skórnej późnej. Jedna z pacjentek miała liszaj płaski. U dwóch osób występowało bielactwo, u czterech - zespół suchości błon śluzowych. U trzech osób stwierdzono czuciową polineuropatię obwodową. Nie stwierdzono korelacji występowania zaburzeń immunologicznych i manifestacji pozawątrobowych z wiekiem, płcią oraz nasileniem zmian w wątrobie i rozwojem marskości.

Tabela I. Zaburzenia immunologiczne oraz manifestacje pozawątrobowe oceniane badaniem przedmiotowym u 93 chorych zakażonych HCV
Table I. Immunological disorders and extrahepatic manifestations (by physical examination) in 93 HCV infected patients

Cechy	Chorzy	
	liczba (n=93)	%
Krioglobulinemia	35	38
Krążące kompleksy immunologiczne	87	94
Czynnik reumatoidalny	38	41
ANA	15	16
SMA	21	23
anty-LKM	5	5
Bóle stawów	21	23
Zmiany skórne (vasculitis)	6	13
Porfiria skórna późna	3	3
Zespół suchości błon śluzowych	4	4
Polineuropatia obwodowa	3	3

DYSKUSJA

U pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C ocenianych w niniejszej pracy stwierdzono częste występowanie zaburzeń i nieprawidłowości reaktywności układu immunologicznego. Patologie związane z zaburzeniami układu immunologicznego opisywano zarówno u pacjentów z ostrym jak i przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (2, 3, 16). Można wyróżnić kilka grup takich zaburzeń. Część z nich zależy od faktu, że zakażenie wirusowe indukuje tworzenie i odkładanie się kompleksów immunologicznych - zarówno w reakcjach ogólnoustrojowych, jak i lokalnie, w poszczególnych tkankach. Występowanie krążących kompleksów immunologicznych stwierdziliśmy u 93,5% badanych chorych. Opisywano także indukcję powstawania autoprzeciwciał i cytotoksycznych limfocytów T oraz bezpośrednie reakcje wirusa z tkankami gospodarza (10, 11, 16). U chorych ocenianych w tej pracy stwierdzono częste występowanie autoprzeciwciał (60%) oraz czynnika reumatoidalnego (41%). Niektórzy autorzy wyjaśniają tworzenie się kompleksów immunologicznych zjawiskiem molekularnej mimikry pomiędzy rdzeniem wirusa C zapalenia wątroby. Inną hipotezą jest występowanie krzyżowej reaktywności antygenowej pomiędzy HCV a nieznanym antygenem wątroby. Niektóre szczepy tego wirusa mają wspólny epitop z cytochromem P-450 z rodziny II D6. Jest to białko przeciwko któremu skierowane są przeciwciała anty-LKM1 (10, 17). W badanej grupie przeciwciała anty-LKM wykryto u 5% pacjentów.

Kompleksy białek wirusa i lipoprotein mogą działać jako super antygeny, powodując syntezę IgM nie reagujących z wirusem, lecz mających aktywność czynnika reumatoidalnego - stwierdzanego u 41% badanych przez nas pacjentów. Kompleksy immunologiczne powstające w wyniku ich działania mogą aktywować układ dopełniacza i brać udział w fizjologicznej odpowiedzi immunologicznej na zakażenia (18). HCV jest wirusem zarówno limfo-jak i hepatotropowym (4, 5, 6, 7, 8, 9). Możliwa jest więc

nieswoista antygenowo stymulacja produkcji IgM w limfocytach B zakażonych przez HCV. Może to wyjaśniać powstawanie krioglobulin - wykrytych u 38% badanych chorych. Jednak fakt, że nie stwierdza się związku między nasileniem patologii wątroby a występowaniem manifestacji pozawątrobowych sugeruje raczej, że odpowiedzialne za nie mogą być raczej czynniki związane z predyspozycjami gospodarza.

Te wszystkie, niekiedy rozbieżne wyniki sugerują, że patogeneza nieprawidłowych zjawisk immunologicznych zależy od wielu czynników, zarówno związanych z zakażeniem wirusowym jak i cechami gospodarza i wymaga dalszych badań, zarówno klinicznych, jak i laboratoryjnych.

WNIOSEK

W przewlekłym zakażeniu HCV często obserwuje się zaburzenia immunologiczne.

Najczęstsze są: krioglobulinemia typu III, występowanie autoprzeciwciał - zazwyczaj w niskim mianie i obecność czynnika reumatoidalnego. Wiek, płeć, rozpoznanie histologiczne i kliniczne objawy marskości wątroby nie wpływają na częstość występowania tych zaburzeń. Objawy kliniczne związane z zaburzeniami immunologicznymi występują rzadko i zazwyczaj nie są nasilone.

J Jabłońska, J Ząbek, J Kozłowska, J Cianciara

IMMUNOLOGICAL DISORDERS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS TYPE C

SUMMARY

Various immunological disorders have been observed freąuently in patients with chronic viral hepatitis C. Hepatitis C virus has been immplicated in the pathogenesis of: essential mixed cryoglobulinemia, crioglobulinemic vasculitis glomerulonephritis, thrombocytopenia, porphyria cutanea tar da, autoimmune thyroiditis (among others).

AIM OF THE STUDY was to determine the prevalence and clinical meaning of immunological disorders in HCV infected patients.

METHODS: 93 HCV infected patients were studied with regard to the presence of cryoglobulins, autoantibodies, rheumatoid factor (RF) and circulating immunological complexes (CIC).

RESULTS: 35 patients out of 93 (38%) had detectable cryoglobulins. Cryoglobulins in 90 cases were of type III and in 3 - of type II. CIC /by immunoelectrophoresis of the PEG sediments/ were found in sera of 87 patients (93,5%). 38 persons (41%) had detectable rheumatoid factor. Antinuclear antibodies were found in sera of 15 patients (16%), anti-smooth muscles antibodies - in 21 persons (23%) and anti-LKMl antibodies - in 5 (5%). Titers of autoantibodies were usually Iow. The most frequent clinical manifestations were arthralgia and skin changes.

CONCLUSION: Immunological disorders /circulating immune complexes (93,5%), autoantibodies (60%), rheumatoid factor (41%), cryoglobulinemia type III (38%)/ are freąuently found in HCV infected patients. Age, gender, histological score and clinical evidence of liver cirrhosis do not influence on rate of these abnormalities .Clinical manifestations of immunological disordes are usually mild.

PIŚMIENNICTWO

1. Grouse LD, Sternberg RJ (red). HCV infection: epidemiology, diagnosis, and treatment (Symposium). The University of Texas, Dallas 1995.

2. Koff RS. Immunologically mediated extrahepatic manifestations of viral hepatitis. W: Krawitt EL, Wiesner RH, eds. Autoimmune liver diseases. Raven Press, New York 1991,233-45.
3. Koff RS. Viral hepatitis. W; Schiff L, Schiff ER (Wyd). Diseases of the liver. Wyd. VII. JB Lippincott Co., Philadelphia 1993,535-45.
4. Artini M, Natoli G, Avantaggiati MI, i in. Detection of replicative intermediates of viral RNA in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C virus carriers. Arch Virol 1993;8:23-9.
5. Ferri C, LaCivita L, Monti M, i in. Chronic hepatitis C and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Q J Med 1996;89:117-22
6. Ferri C, Monti M, La Civita L, I inl. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. Blood 1993;82:3701-704.
7. Muller HM, Kallinowski B, Solbach C, i in. B-lymphocytes are predominantly involved in viral propagation of hepatitis C virus (HCV). Arch Virol 1994; 9:307-16.
8. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, i in. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. J Gen Virol 1993;74:669-76.
9. Zigneno AL., Macchia D, Monti M, i in. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. J Hepatol 1992;15:382-86.
10. Pawlotsky JM, Yahia MB, Chantal A, i in. Immunological Disorders in C Virus Chronic Active Hepatitis: A Prospective Case-control Study. Hepatology 1994; 19: 841-48.
11. Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, i in. Extrahepatic Immunologic Manifestations in Chronic Hepatitis C and Hepatitis C Virus Serotypes. Ann Intern Med 1995;122:169-73.
12. Davada R, Peterson J, Weiner R, i in. Membranous glomerulonephritis in assotiation with hepatitis C infection. Am J Kidney Dis 1993;22:452-55.
13. Rollino C, Roccatello D, Giachino O, i in. Hepatitis C virus infection and membranous glomerulonephritis. Nephron 199;59:319-20.
14. Johnson RJ, Gretch DR, Yambe H, i in. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. N Engl J Med. 1993;328:467-70.
15. Lunel F, Musset L, Cacoub P, i in. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. Gastroenterology 1994;106:1291-300.
16. Wilson RA. Extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis. Am J Gastroenterol 1997;92:4-17.
17. Giostra F, Manzin A, Lenzi M, i in. Low hepatitis C viremia levels in patients with anti-liver/kidney microsomal antibody type 1 positive chronic hepatitis. J Hepatol 1996;25:433-38.
18. Chen PP, Fong S, Goni F, I in. Cross-reacting idiotypes on cryoprecipitating rheumatoid factor. Springer Semin Immunopathol 1988;10:35-55.

Adres autorów:
Joanna Jabłońska
Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych AM
ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa
tel. 0-prefiks-22 632-06-04, e-mail: liver@zigzag.pl