

KRONİK HBV ENFEKSİYONU İLE DOKU GRUPLARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

HLA-A, B, C, AND DR ANTIGENS IN CHRONIC HEPATITIS B INFECTION

Aziz HACIBEKTAŞOĞLU*, Altuğ BARUT**, Ali İNAL**

Özet: Serolojik ve histopatolojik olarak kronik Hepatit B Virus (HBV) enfeksiyonu tanısı konulan 168 olgunun (71 olgu Kronik Aktif Hepatit, 97 Kronik Persistan Hepatit) HLA-A, B, C ve DR fenotip özellikleri araştırıldı. Olguların 113'ü erkek, 55'i kadındı ve yaş ortalaması 23.2 (21-52) olarak bulundu. Kontrol grubu 174 sağlıklı kişiden (107 erkek, 67 kadın) oluşmaktaydı ve yaş ortalaması 26.4 (20-54) idi. HLA-A, B, C lokuslarından, HLA A3 ($p < 0.01$), HLA A11 ($p < 0.01$), HLE B31 ($p < 0.05$) ve HLA B51 ($p < 0.01$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında olgularda daha sık rastlanan lokuslar olarak belirlendi. Diğer HLA-A, B, C ve DR fenotip dağılım ve rastlanma sıklığında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı özellik olmadığı görüldü.

Summary: HLA-A, B, C and DR locus specificities studied in 168 patients (71 Chronic active Hepatitis, 97 Chronic Persistant Hepatitis) serologically and histopathologically proven Chronic Hepatitis B Virus infection. There were 113 men and 55 women with a mean age of 23.2 (21-52) years. Hundred and seventy four healthy subjects (107 men, 67 women) included in control group with a mean age of 26.4 (20-54) years. The frequency of HLA A3 ($p < 0.01$), HLA A11 ($p < 0.01$), HLA B35 ($p < 0.05$) and HLA B51 ($p < 0.01$) were significantly higher in patients than in healthy control subjects. Comprasions among the other HLA-A, B, C and DR locus were found to be statistically non-significant.

G İ R İ Ş

Günümüzde kronik hepatit B virus (HBV) enfeksiyon immunpatogenezinde konağa ait immun savunma mekanizmalarının karaciğer hücre hasarına yol açtığı ve oluşan hasarda HBV'nin doğrudan sitopatik etkisi olmadığı konusunda görüş

* Doç. Dr. GATA, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı.

** Dr., GATA, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzm. Öğr.

birliği sağlanmıştır 51, 2). Kronik HBV enfeksiyonlarında karaciğer hasarından HBcAg (Hepatit B Virus Core Antigen) spesifik sitotoksik T-lenfositler (CD8+) sorumludur. CD8 (+) T-lenfositlerin yansırı HBcAg spesifik CD4 (+) T-lenfositlerin de kronik HBV enfeksiyonun hepatosit hasarından sorumlu olduğu bildirilmektedir (3, 4, 5).

Son yıllarda pek çok araştırmacı HBV enfeksiyonunun prognozunda genetik faktörlerin rolünü araştıran çalışmalar yapmıştır (7, 8). Bu çalışmalarda henüz kesin bir sonuç elde edilememesine rağmen HBV replikasyonunun sürdüğü hepatositlerin sitotoksik T-lenfositler (CD8+) tarafından lizise uğratılmasında Class-I majör histokompatibilite (MHC) antijenlerinin etkinliği, özellikle nekro-inflamatuvar lezyonlar da Class-I MHC antijen artışı ile gösterilmektedir (1, 9, 10). Karaciğer parankim hücrelerinde Class-II MHC antijenlerinin bulunması inflamasyon bölgesinde CD4 (+) lenfositler ile makrofajların etkinliğini de göstermektedir (2, 3, 9, 11).

Yapılan çalışmalarda HLA-A, B, C ve DR'lere ait özellikler araştırılarak bunların HBV sekilleri (kronik HBV enfeksiyonu, siroz, hepatosellüler karinomoma vb.) ile ilişkileri gösterilmeye çalışılmaktadır. Biz çalışmamızda HBV sekti olarak gelişen kronik hepatit tablosunda HLA-A, B, C ve DR fenotip özelliklerini araştırdık.

MATERYAL ve METOD

1989-1991 yılları arasında GATA (Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğinde takip edilen ve kronik HBV (Hepatit B Virus) enfeksiyonu tanısı konulan 168 olgunun doku tiplendirmesi yapıldı. 113'ü (% 67.2) erkek, 55'i (% 32.7) kadındı ve yaş ortalaması 23.2 (21-52) bulundu. Olguların tümünde kronik HBV enfeksiyon tanısı, serolojik ve histopatolojik olarak konuldu. Çalışmaya alınan olguların tümünde serum transaminaz düzeyleri normalin 2.5-7 katı yüksekti ve histopatolojik olarak 71 (% 42.2) olguda kronik aktif hepatit (KAH), 97 (% 57.8) olguda kronik persistan hepatit (KPH) saptandı.

Kontrol grubu olarak seçilen 174 sağlıklı kişide serolojik olarak HBV'ne ait markerlar araştırıldı ve 6 sağlıklı bireyde geçirilmiş ve tamamen iyileşmiş HBV enfeksiyonu olduğu gösterildi. Kontrol grubunda 67 (% 38.5) kadın ve 107 (% 61.5) erkek yer aldı. Bu grupta yaş ortalaması 26.4 (20-54) bulundu. Çalışmada ve kontrol grubunda yer alan olguların ve sağlıklı gönüllülerin hiçbiriri akraba değildi. Doku grubu tayinleri Terasaki mikrolenfositotoksiste yöntemi kullanılarak yapıldı. ACD (Amine Citrat-Dextrose) içeren 10 ml hazır vakumlu tüpler (Becton-Dickenson, ABD) içine 7 ml venöz kan örneği alındı. Kan örnekleri +4 derece soğutulara kadar soğutulularak HLA (Human lökosit-Antijen) A, B, C, DR tayini için 2 ayrı polysterilen tüp içine eşit miktarda ayrıldı. Bu örneklerin üzerine HLA-A, B, C için anti-CD8 ve HLA-DR için anti-HLA Class-II ile kaplı manyetik

boncuk içeren ayırma solüsyonlarından (Dyna Beads, Behring/Almanya) 100 µl konuldu. Miknatıslı tüp tutucular ile ayrılan CD8 5+) T-lenfositler HLA-A, B, C tiplendirmesinde, B-lenfositler ise HLA-DR tiplendirmesinde kullanıldı. Doku tiplendirmesinde kullanılan Terasaki plakları HLA-A için 10, B için 18, C için 3, DR için 9 antijen bulunuyordu. HLA-A, B, C için 30 dakika, DR için 45 dakika oda ısısında yapılan inkübasyondan sonra 5 ml tavşan komplemanı eklenecek plaklar aynı sürelerde inkübe edildi. Inkübasyon sonunda herbir çukura 1 ml ethinidium bromide/Acridine orange karışımından konularak pozitif reaksiyonlar değerlendirildi. Hücre ölümünün % 80'nin üzerinde olduğu çukurlar pozitif kabul edildi.

HBV markerları mikro-ELISA yöntemi (Wellcome/Dartford/İngiltere) kullanılarak araştırıldı.

İstatistik analizler CDC (Centers for disease Control)'nin epidemiyolojik information paketi programı kullanılarak, P anlamlılık, X2 dağılım ve yüzde güvenilirlik sınırları ile birlikte yapıldı. Relatif risk hesaplamalarında Woolf'un önerdiği formül kullanıldı (12).

S O N U Ç L A R

Tablo I ve II'de kontrol grubu ve olgulara ait HLA-A, B, C ve DR lokuslarının fenotip sıklığı yer almaktadır.

HLA-A, B, C lokus tiplendirmesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HLA-A11 (p < 0.01, X2; 10.68), HLA B35 (p < 0.05 X2; 6.35) ve HLA-B51 (p < 0.01 X2; 6.23) lokuslarının olgularda rastlanma sıklığının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulduk. HLA-A3 (p < 0.01, X2; 15.73) ise olguların yer aldığı grupta rastlanma sıklığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalmış olarak bulundu.

Kronik HBV enfeksiyon sekellerine ait (Kronik peristan ve kronik aktif hepatit) HLA-A, B, C ve DR lokus fenotiplendirmesinde herhangi bir lokusun bir diğeriyle oranla daha sık rastlanmadığını bulduk. Ancak bazı lokuslara sağlıklı popülasyonda rastlanma oranlarının kronik HBV enfeksiyonu olan olguların yer aldığı grupta karşılaştırıldığında yüzde rastlanma sıklığı oranı yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. HLA-A1 fenotipinin sağlıklı kontrol grubunda % 59.7 oranında bulunmasına karşılık, olguların yer aldığı grupta bu oran % 73.2 bulundu (p < 0.1) HLA-A3 fenotipine sağlıklı kişilerde rastlanma oranı yüksek iken, bu fenotipin kronik HBV enfeksiyonu olan grupta rastlanma sıklığının daha az olduğu bulundu (p < 0.001). Buna karşılık HLA-A11 olguların yer aldığı grupta daha sık rastlanan fenotipti. (p < 0.01) HLA B35 ve HLA B51'de olguların yer aldığı grupta daha sık rastlanan lokuslardır. (Sırası ile p < 0.001). Diğer fenotiplerin dağılım ve rastlanma sıklığı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunamadı.

Tablo 1

HIA-A, B, C Lokuslarının Kontrol Grubu ve Olgular Arasında Dağılımı

HIA LOKUS	KONTROL GRUBU n=174	%	KRONİK HBV İNFEKSİYONU KPH, n=57	KOH, n=71	TÜPLAM n=168	%	χ^2	PP	RR
A1	104	59.7	68	55	123	73.2			
A2	134	77.1	70	51	121	72.5			
A3	77	44.2	6	11	19	11.3	15.73	(0.001)	6.3
A9	105	60.3	82	64	146	86.9			
A10	31	17.8	18	9	27	16.			
A11	36	20.6	46	45	91	54.1	10.68	(0.01)	9.
A25	3	1.7	5	2	7	4.1			
A26	21	12.	16	12	34	20.2			
A28	68	39.7	29	40	69	42.			
A30+31	3	1.7	1	1	2	1.1			
B5	32	32.8	41	48	89	52.9			
B7	35	20.1	30	13	43	25.5			
B8	40	22.9	17	12	29	17.2			
B12	40	22.9	21	15	36	21.4			
B13	17	9.7	5	9	14	8.3			
B14	9	5.1	4	7	11	6.5			
B17	6	3.4	3	4	7	4.1			
B27+7	35	20.1	13	18	31	18.4			
B35	91	52.2	98	67	154	92.6	6.53	(0.05)	2.5
B40	14	8.1	7	4	12	7.1			
B44	18	10.3	11	12	23	13.6			
B51	25	14.3	33	23	56	33.3	6.25	(0.01)	2.4
BM4	122	70.1	64	51	115	68.4			
BMB	158	90.8	70	68	138	82.1			
BMB2	18	10.3	10	11	21	12.6			
BMB55	6	3.4	3	2	5	2.9			
BMB60	1	0.5	-	-	-	0			
BMB73	6	3.4	2	3	5	2.9			
CM2	49	28.1	17	23	40	23.			
CM3	54	31.5	21	30	51	30.3			
CM4	156	89.6	79	55	134	79.7			

Tablo 2

Lokusların Kontrol Grubu ve Olgular Arasında Dağılımı

HLA LOKUS	KONTROL GRUBU n=174	KRONİK HBV ENFEKSİYONU KPH, n=97	KAH, n=71	TOPLAM n=168	%2	PP	KR
DR1	99	32	49	101	60,1		
DR2	9	5	3	8	5,3		
DR3	85	38	54	92	54,7		
DR4	79	49	32	81	48,2		
DR5	68	30	36	66	39,2		
DR7	45	22	29	51	30,5		
DRB*2	97	35	41	96	57,1		
DRB*3	115	53	65	118	70,2		
DM1	11	2	0	10	5,9		

KPH:Kronik Persistant Hepatit, KAH:Kronik Aktif Hepatit KR:Relatif Risk

T A R T I Ş M A

Çalışmamızda, Class-II MHC antijenleri ile kronik HBV enfeksiyon sekelleri arasında herhangi bir bağlantı olmadığını, buna karşılık Class-I MHC antijenleri ile bağlantı olabileceğini gösterdik.

HLA B35 fenotipinin rastlandığı kronik HBsAg taşıyıcılarında kronik aktif hepatit gelişme riskinin daha yüksek olduğu ilk kez Mazilli ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (12). Benzer çalışmalar da HLA B35 fenotipinin rastlanma sıklığının istatistiksel olarak sık bulunduğu olgularda HBV enfeksiyonunun kronikleşme eğiliminin yüksek olduğunu göstermiştir (13, 14). Özellikle doğu toplumlarında HLA-B35 oldukça sık rastlanan bir MHC antijenidir (15, 16). HLA-B35 ve HLA-B51 de bu gruplarda pek çok çalışmada istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte rastlanma sıklıklarının fazla olması nedeni ile dikkatleri üzerlerine geçen antijenlerdir. HLA-B8, HLA-B15 ve HLA-B17 özellikle batılı toplumlarda kronik HBsAg taşıyıcıları ve kronik HBV sekelleri gelişen olgularda sık rastlanan antijenlerdir (17, 18). Bu grupların bir kısmında HLA-DR3 veya HLA-DR5 sıklığının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterilmektedir (19).

HLA-A1 ve HLA-B8 arasında dağılım ve bir arada bulunma özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda herhangi bir bağlantı olmadığı gösterilmiştir (20). Çalışmamızda HLA-B8 her iki grupta (kontrol ve kronik HBV) sırası ile % 22,9 ve % 17 oranlarında görülürken HLA-A4'in özellikle olguların yer aldığı grupta rastlanma sıklığının yüksek olduğu görüldü. Bu iki antijenin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesindeki rolü tartışmalıdır (12, 13). Buna karşılık HLA-A11 sıklığının

olguların yer aldığı grupta istatistiksel olarak anlamlı olması HLA-A11 pozitifliğinin HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde predispozan faktör olabileceğini düşündürmektedir (17). Kronik persistan veya aktif hepatiti olguların hiçbirinde bu patolojiye yol açabilecek genetik predispozan bir fenotip saptanmaz iken, enfeksiyonun kronikleşmesinde doğrudan etkin olabilecek lokusların varlığına inanılmaktadır. HBV'ye bağlı siroz ve Hepatosellüler karsinoma (HSK) gelişen olguların da yer aldığı çalışmalarda özellikle batı toplumlarında HSK riskinin arttığı fenotip özellikleri üzerinde durulmasına karşın (21), doğulu toplumlarda bu tip bulgular elde edilememektedir (7, 12). Çünkü etiyojisi, immunoloji ve irk faktörleri hastalığın seyri ve immün cevap mekanizmalarına etkili olabilmektedir (14, 15).

Sağlıklı bireylerin yer aldığı kontrol grubunda HLA-A3'e rastlanma oranı olguların yer aldığı gruba oranla oldukça yüksek bulundu. HLA-A3'ün, kronik HBV enfeksiyonundan korunmada veya akut enfeksiyonun eradikasyonunda etkili bir antijen olabileceği düşünülmektedir (16).

Ülkemizde HBSAg taşıyıcılığının yüksek olduğu ve popülasyonda sık rastlanılan doku grup antijenleri ile kronik HBSAg taşıyıcılığına bağlı olarak ortaya çıkan sekeller arasında ilişki olabileceği gösterilmiştir (177).

Kronik HBV enfeksiyonu ile doku grupları arasındaki ilişkinin araştırıldığı geniş kapsamlı çalışmalar ülkemizde henüz yeterli değildir.

HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde etkin olabileceği düşünülen pekçok MHC antijeni üzerinde çalışılmıştır. Doğulu araştırmacılar, kronik HBV enfeksiyonunda HLA-B5, HLA-B35, HLA-B51, HLA-B8 (14, 19), HLA-B13 (20), HLA-BW54, HLA-DR3 (13), HLA-DR4, HLA-DR5 (15, 22) fenotipleri ile enfeksiyon seyri arasında bağlantı olduğunu göstermektedirler. Batılı toplumlarda, HLA-A11, A3 (23), HLA-B17, B14 (12), HLA-B12 (24), HLA-B8 (20), HLA-B17 ve HLA-DR3 ile kronik HBV'nun gidişi arasında ilişki olabileceği savunulmaktadır (12, 18, 20).

Aktif virus replikasyonunun sürdürdüğü olgularda karaciğer hücre hasarının yüksek olmasının nedeni virus proteinleri (antijenleri) ile işaretli hücrelerin immün sistemin saldırılarından korunamamasıdır. Kronik HBV enfeksiyonunda MHC Class-I antijenlerinin doku örneklerinde yer alma oranı yüksektir (3, 5). Buna karşılık MHC Class-II antijenlerinin bu şekilde bir artış göstermediği bilinmektedir (6). Ancak immünün cevap regülasyonunda CD4 (+) lenfositlerin ve makrofajların hem antikor yapımı, hem de enfekte hücrelerin hızlı eradikasyonunda rolü olabileceği unutulmamalıdır (7, 8).

Kronik HBSAg taşıyıcılığına bağlı olarak gelişen kronik aktif hepatitte intrahepatik mononükleer hücre infiltrasyonu, güve yenigi nekrozunun patogene-zinden sorumludur (2). Bu hücreler ile MHC Class-II antijenleri arasındaki

ilişkının, aktive olmuş T-lenfositlerinin yüzeylerinde HLA-DR antijenlerinin artışı ile olan ilişkisi tam olarak gösterilememiştir (1, 2, 7).

HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde, immunitoleransın ve özellikle perinatal (horizontal) geçişin önemli olduğu toplumlarda kronik enfeksiyonun meydana getirdiği sekellerin doku grup antijenleri ile ilişkisi üzerinde önemle durulmaktadır (25).

Bulduğumuz sonuçlar ile Türk popülasyonunda akut HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde rol oynayan doku grup antijenleri arasında HLA-B35, HLA-B51 ve HLA-A11'i taşıyan olguların risk grubunda olduğu, buna karşılık HLA-A3'ün yüksek oranda saptandığı olgularda enfeksiyonun kronikleşme riskinin daha düşük olduğu ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

- Desmet VJ: Immunopathology of chronic viral hepatitis. *J Hepatogastroenterol*, 38: 14-21, 1991.
- Ganem DH, Varnus E: The molecular Biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem*, 56: 651-693, 1987.
- Hsu HC, Su JJ, Lai MY: Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis-B core antigen expression in the natural course of chronic HBV infection. *J Hepatology*, 5: 45-50, 1987.
- Milich DR, McLachlan A, Stabe S: Comparative immunogenicity of hepatitis-B virus core and e antigens. *J Immunol*, 141: 3617-3627, 1988.
- Ferrari C, Penna A, Guberti T: Intrahepatic, nucleocapaid antigen-specific T-cells in chronic active hepatitis-B. *J Immunol*, 139: 2050-2054, 1987.
- Alexander GJM: Immunology of hepatitis-B infection. *British Medical Bulletin*, 46 (2): 354-367, 1990.
- Theilmann I, Goeser T: Interactions of hepatitis-B virus with Hepatocytes: Mechanism and clinical prevalence. *J Hepato-Gastroenterol*, 38: 10-B, 1991.
- Fukunato T, Gerber MA, Thung SN, Schaffner F: Expression of HLA Class-I Antigens on Hepatocytes in Liver Disease. *Am J Pathol*, 123: 264-270, 1986.
- Schödel F, Weimer T, Will H: HBV molecular Biology and immunology. *Biotech Bulletin*, 4: 63-83, 1990.
- Arnaud G, Coulombier JM, Marcellin P, Allan A: HbsAg clearance in chronic active Hepatitis B: Interence with HLA, Digestive diseases and science, 37 (7): 700-704, 1992.
- Desmet VJ: Immunopathology of chronic viral Hepatitis, *Hepatogastroenterology*, 38: 14-21, 1991.
- Mazilli MCS, Trabace F, Dirainondo G, Gandini E: HLA and chronic active hepatitis. *Digestion*, 15: 278-285, 1977.
- Hattum JV, Schreuder M, Schaim SM: HLA antigens in patients with various courses after hepatitis-B virus infection. *Hepatology*, 7: 11-14, 1987.
- Sung JJ: Hepatitis B virus infection and its sequelae in Tarrnan Proc. *Natl Sci Courc ROC*, 5: 385-399, 1981.
- Lin DY, Liaw YF, Huang CC: The distribution of HLA-A, B, C and DR antigens in chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Tissue Antigens*, 29: 110-114, 1987.
- Mota AH, Fainboim H, Terg R, Fainboim L: Association of chronic active hepatitis and HLA-B35 in patients with hepatitis-B virus tissue antigens. 30: 283-240, 1987.

17. Kilby AE, Albertini RJ, Krawitt EL: HLA Typing and Autoantibodies in hepatitis-B surface antigen-negative chronic active hepatitis. *Tissue Antigens*. 28: 214-217, 1986.
18. Krawitt EL, Kilby AE, Albertini RJ, Schanfield MS, Chastaney BF, Harper PC, Mickey RM, McAuliffe TL: Immunogenetic studies of autoimmune chronic active hepatitis: HLA, Immunoglobulin Allotypis and Autoantibodies. *Hepatology*, 7: 1305-1310, 1987.
19. Parham P, Lomen CE, Lawler DA, Ways JP, Holmes N, Coppin HL, Salter RD: Nature of polymorphism in HLA-A, B and C Molecules. *Prof Natl Acad Sci*, 85: 4005-4009, 1988.
20. Paterson AC, Sciort R, Kew MC, Callea F, Dusheico GM, Desmet VJ: HLA Expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 57: 369-373, 1988.
21. Yang PM, Sung JL, Khen DS: HLA-A, B, C and DR antigens in chronic hepatitis B viral infection. *Hepatogastroenterol*, 36: 363-366, 1989.
22. Doffoel M, Tongio J, Gut P: Relationship between 34 HLA-A, HLA-B and HLA-DR, antigens and three serological markers of viral infection in alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 6: 457-463, 1986.
23. Zervas J, Karvounis G, Theodoropoulos G: HLA antigens and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 78: 601-605, 1988.
24. Bassendine MF, Pevar OF: HLA-DR antigens in primary biliary cirrhosis: Lack of association. *Gut*, 26: 625-628, 1987.
25. Thomas H: Pathogenesis of chronic active hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 6 (1): 4-7, 1991.