

HEPATİT-C VİRUS ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDA KARACİĞER-BÖBREK MİKROZOMAL (LKM) ANTİJENLERİNE KARŞI OTOANTİKOR VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF AUTOANTIBODIES
AGAINST LIVER KIDNEY MICROSOMAL (LKM) ANTIGENS IN
PATIENTS WITH HEPATITIS-C VIRUS INFECTION

Dürdal US, Gülşen HASÇELİK*, Ayfer GÜNALP**

ÖZET: Akut yada kronik B ve C tipi viral hepatitler sırasında bazı immunolojik mekanizmalara bağlı olarak karaciğer dışı tutulumların ortaya çıktığı bilinmektedir. Son yıllarda hepatit C virus (HCV) enfeksiyonlarında, özellikle tip 2 otoimmün hepatitin belirleyicisi olarak kabul edilen karaciğer-böbrek mikrozomal (LKM) antijenlerine karşı antikorların varlığı giderek artan oranlarda rapor edilmeye başlamıştır. Bu amaçla, sunulan çalışmada HCV enfeksiyonu olan hastalarda anti-LKM antikorlarının araştırılması planlanmıştır.

Çalışmaya, anti-HCV ve HCV-RNA pozitif 37 kadın ve 49 erkek olmak üzere toplam 86 hasta (yaş aralığı 18-64, yaş ortalaması: 38±2) dahil edildi. Hastaların 35'i hemodiyaliz, 26'sı gastroenteroloji, 13'ü nefroloji, 8'i yoğun bakım, 2'si kalp ve damar cerrahisi, 2'si de genel cerrahi ünitesi hastası olup, hepsinde hepatit B (HBV) ve hepatit D virus (HDV) aktif enfeksiyon belirleyicileri negatif idi. Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ise 40-350 U/L arasında değişmekteydi. LKM1 antikorları indirekt immunofloresan yöntemle araştırıldı ve hastaların 6 (%6.9)'sında 1/80 titrede pozitif olarak bulundu. Bu hastaların 3'ü hemodiyaliz, 2'si gastroenteroloji ve 1'i kalp ve damar cerrahisi hastasıydı.

Sonuç olarak, HCV enfeksiyonu olan hastalarda LKM1 antikor pozitifliğinin çok yüksek oranda saptanmamasına karşın bu antikorların araştırılması, gerek enfeksiyon sırasında otoimmün hastalıkların gelişmesinin takibinde gerekse tedavi protokolünde yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Hepatit C virus, otoantikor, LKM antikorları.

SUMMARY: The extra-hepatic immunological manifestations are known to be common in both acute and/or chronic hepatitis B and C infections. Recently, the relationship between hepatitis C virus (HCV) infection and the presence of

* Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

liver-kidney microsomal autoantibody type 1 (LKM-1) which has a serodiagnostic value especially for type 2 autoimmune hepatitis, have been shown in many studies. So the present study was planned in order to investigate the presence of autoantibodies against LKM-1 antigens in patients with HCV infection.

A total of 86 patients of which 37 female and 49 male, ages between 18-64 years old (mean age: 38 ± 2 years) were included to the study. All patients were positive for anti-HCV and HCV-RNA, but negative for markers of active hepatitis B and/or hepatitis D virus infections, and alanine aminotransferase (ALT) levels were between 40-350 U/L (normal values: 5.00-40.0 U/L). Antibodies against LKM-1 antigens were investigated by indirect immunofluorescence method and 6 of 86 patients (6.9%) were found positive at 1/80 dilutions. Three of these patients were from hemodialysis, 2 from gastroenterology and 1 from cardiovascular surgery units.

As a result, although anti-LKM1 seropositivity rate was found low, the investigation of LKM 1 antibodies in HCV infected patients would be useful both following the prognosis of viral hepatitis by means of autoimmune disorders and deciding the therapy protocols.

Key words: Hepatitis C virus, autoantibody, LKM antibodies.

GİRİŞ

Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonu sırasında, esansiyel mikst kriyoglobulinemi, glomerülonefrit, poliartritis nodosa, Sjögren sendromu, romatoid artrit, idiopatik pulmoner fibrozis, vaskülit, porfiria kutanea tarda ve liken planus gibi çok sayıda klinik tablo ile seyreden karaciğer dışı tutulumların ortaya çıktığı bilinmektedir¹⁻⁵. Bu hastalıkların patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmasına karşın immunolojik mekanizmaların rolü olduğu düşünülmekte ve HCV'nin idiopatik otoimmun hepatitlere (ÖİH) benzer otoimmun reaksiyonlara neden olabileceği tartışılmaktadır⁶.

Etiyolojisi bilinmeyen ve konağın kendi karaciğer dokusuna karşı artan bir immun cevap sonucu ortaya çıkan ÖİH'ler, hastalık sırasında saptanan otoantikörlerin tiplerine ve paternlerine göre sınıflandırılmaktadır⁷. Bunlardan biri olan karaciğer-böbrek mikrozomal (LKM) antikörleri, hücre sitoplazmasında bulunan sitokrom P-450'nin 3 farklı epitopuna karşı oluşan otoantikörlerdir⁸. Anti-LKM1 antikörleri ÖİH tip 2, anti-LKM2 antikörleri, ilaçla indüklenmiş hepatit ve anti-LKM3 antikörleri hepatit-D ile ilişkili ÖİH'lerde serolojik belirleyici olarak kullanılmaktadır⁸⁻¹⁰. Sitokrom P-450 IID6'ya karşı oluşan LKM1 antikörlerinin pozitifliği ile karakterize olan tip 2 ÖİH'in HCV ile ilişkili olduğu ve HCV'li hastaların %0-7'sinde de bu antikörlerin saptanabildiği ifade edilmektedir¹¹⁻¹⁴. Bu durum bazı araştırmacılar tarafından HCV'un tetiklediği otoimmun mekanizmalara bağlanırken, bazı araştırmacılar tarafından da otoimmun hepatit ile viral hepatitin örtüşmesi (overlap) lehine yorumlanmakta ve anti-viral yada anti-immunolojik tedavi protokolünün belirlenebilmesi için yönlendirici olduğu

bildirilmektedir^{7,15-18}. Dolayısıyla HCV enfeksiyonu sırasında tip 2 OİH belirleyicisi olan LKM1 antikorlarının tesbit edilmesi gerek enfeksiyonun prognozu gerekse uygulanacak tedavi açısından önemli olabilecektir.

Bu amaçla sunulan çalışmada, HCV enfeksiyonu olan hastalarda LKM-1 otoantikorlarının varlığı ve görülme sıklığının araştırılması planlanmıştır.

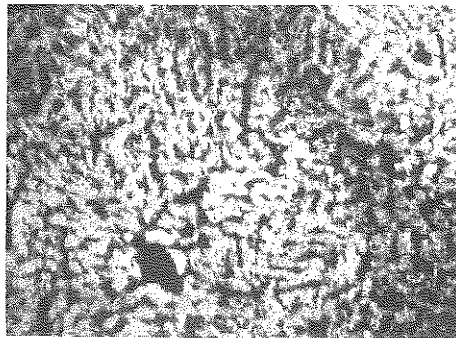
HASTALAR ve YÖNTEMLER

Hastalar: Çalışmaya, anti-HCV ve HCV-RNA pozitif 37 kadın ve 49 erkek olmak üzere toplam 86 hasta dahil edildi. Hastaların 35'i hemodiyaliz, 26'sı gastroenteroloji, 13'ü nefroloji, 8'i yoğun bakım, 2'si kalp ve damar cerrahisi, 2'si de genel cerrahi ünitesi hastasıydı. Hastaların yaş aralığı 18-64 olup, yaş ortalamaları 38 ± 2 idi.

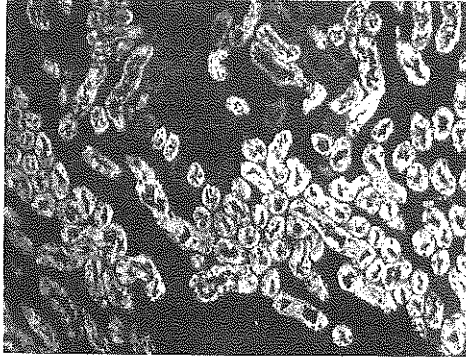
Hastalarda HCV'e karşı antikorlar üçüncü kuşak enzim immunoassay (AxSYM 3.0, Abbott) yöntemiyle, viral nükleik asit ise reverstranskriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile ikişer kez çalışılarak konfirme edilmek suretiyle saptandı. Hastalardan alınan serumlar çalışılincaya kadar -20°C 'de saklandı.

LKM-1 antikorlarının araştırılması: Serum örneklerinin 1/20, 1/40 ve 1/80 oranlarında sulandırılmaları yapılarak, immünofloresan (IF) yöntemiyle (Euroimmun GmbH, Germany) çalışıldı. Bu amaçla sıçan karaciğer ve böbrek dokularının fikse edildiği özel lamalar kullanıldı. Sulandırılmış serum örneklerinden 25'er μl dokuların üzerine damlatılarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra fosfat tamponlu solüsyon (PBS, pH: 7.2) ile yıkanarak florescein isotiosyanat ile işaretli anti-insan IgAGM antikor konjugatından 25 μl damlatıldı ve tekrar oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda PBS ile yıkama işlemi yapıldı ve fosfatla tamponlanmış (pH: 8.4) gliserol damlatılarak 40X objektifle floresan mikroskopta değerlendirildi. Her çalışmada LKM1 pozitif ve negatif referans kontrol serumlar kullanıldı.

Değerlendirmede; karaciğer dokusunda hepatositlerin sitoplazmasının yaygın floresan boyanması ve böbrek dokusunda sadece proksimal tübüllerin ince granüler tarzda floresan boyanması pozitif olarak kabul edildi⁸ (Resim 1).



Resim 1a: Sıçan karaciğer dokusunda hücrelerin yaygın floresan boyanması.



Resim 1b: Sıçan böbrek dokusunda proksimal tübüllerin floresan boyanması (40X).

BULGULAR

Hastalarda saptanan anti-HCV düzeyleri sınır değere ($S/CO \geq 1.00+0.5$) göre oldukça yüksek olup (min:15.8, max: 146.5) şüpheli bir değer tesbit edilmedi. Tüm hastalarda HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM, HDV-Ag ve anti-HDV belirleyicileri negatifti. Otuzbeş hemodiyaliz hastasının 15'inde (%42.8) aşılarmaya bağlı olarak sadece anti-HBs pozitif, 9'unda ise (%25.7) geçirilmiş enfeksiyonu ifade eden anti-HBs ve anti-HBc total pozitif olarak bulundu.

ALT düzeyleri ise (normal değer: 5.00-40.0 U/L); 21 hastada >200 U/L, 54 hastada 100-200 U/L, 11'inde 40-100 U/L sınırları arasında değişmekteydi.

Anti-HCV ve HCV-RNA pozitif olan 86 hastanın 6 (%6.9) 'sında LKM1'e karşı otoantikor pozitifliği saptanmıştır. Bu hastaların 3'ü hemodiyaliz, 2'si gastroenteroloji ve 1'i kalp ve damar cerrahisi hastasıdır. Bu hastaların özellikleri Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I: LKM Pozitif Olan HCV'li Hastaların Özellikleri

No.	Yaş	Cins	Anti-HCV Düzeyi (S/CO)	HCV-RNA	Diğer Hepatit Belirleyicileri	ALT Düzeyi (U/L)	Bölüm
1	28	E	86	+	-	344	Hemodiyaliz
2	44	K	125	+	Anti-HBs (+)	280	Hemodiyaliz
3	19	K	77	+	-	95	Hemodiyaliz
4	36	E	35	+	-	57	Gastroenteroloji
5	40	K	91	+	-	165	Gastroenteroloji
6	61	E	102	+	-	118	Kalp Damar Cer.

TARTIŞMA

Anti-LKM1 pozitifliği ile karakterize tip 2 otoimmün hepatitler, HCV enfeksiyonunun eşlik edip etmemesine göre iki grupta sınıflandırılmaktadır. OIH tip 2a'da HCV enfeksiyonu mevcut olmayıp daha ziyade çocukluk çağında

görüldürken, tip 2b'de HCV enfeksiyonu varlığı söz konusudur ve daha ileri yaşlarda görülmektedir⁷. Ayrıca bu tiplerin tedavileri de farklı olup, tip 2a'da steroid tedavisine cevap alınırken, tip 2b'de immunosüpresif tedavinin yeri yoktur ve alfa interferon tedavisi uygulanmaktadır^{16,19,20}. Dolayısıyla LKM1 antikoları 2 farklı klinik tabloda da ortaya çıkabilmekte, hatta bazı hastalarda bu kliniklerin örtüştüğü düşünülmektedir¹³.

Son yıllarda birçok araştırmacı tarafından bildirilen bu ilişkiyi araştırmak amacıyla planlanan bu çalışmada, anti-HCV ve HCV-RNA pozitif 86 hastanın 6'sında (%6.9) anti-LKM1 pozitifliği saptanmıştır. Bu oranı; Calleja ve arkadaşları²¹ %66.6, Bellary ve arkadaşları²² %1.2, Abuaf ve arkadaşları¹⁹ %5, Clifford ve arkadaşları¹⁷ kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda %3, Borlotti ve arkadaşları²³ çocuk popülasyonda %10 olarak bildirirken, Leri ve arkadaşları²⁴ hiç saptamadıklarını rapor etmişlerdir. Anti-LKM1 pozitif olan otoimmün hepatitli hastalarda ise anti-HCV pozitifliği; Lenzi ve arkadaşları¹⁴ tarafından İtalyan popülasyonda %90, Fransız ve Alman araştırmacılar^{15,25} tarafından %50'ye varan oranlarda, Czaja¹⁶ tarafından ABD'de %4 olarak bildirmiş ancak İngiliz popülasyonda hiç saptanmamıştır¹⁴. Yurdumuzda da HCV enfeksiyonu ile çeşitli otoantikoların oluşumu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar mevcuttur²⁶⁻²⁹. Ancak Ersöz ve arkadaşlarının LKM antikolarını araştırdığı çalışmasında hiç bir hastada anti-LKM pozitifliğine rastlanmamıştır³⁰.

Dolayısıyla, HCV hepatiti sırasında anti-LKM1 pozitifliğinin çok farklı oranlarda saptanması, HCV'in bazı bölgelerde endemik olması, coğrafi dağılım, genetik faktörler ve HLA tipleri gibi faktörlere bağlı olabileceğini düşündürmektedir^{7,14,24,31,32}. LKM otoantikolarının patogenezdaki rollerinin tam olarak bilinmemesine karşın, bu antikoların direkt doku hasarına neden olmadığı, asıl hasarın karaciğere infiltre olan T lenfositlerinin sitokrom P-450 molekülüne karşı oluşturdukları immun cevap sonucu ortaya çıktığı fikri kabul görmektedir⁸.

LKM otoantikolarının saptanmasında immunfloresan (IF), kompetitif ELISA ve immunoblotting yöntemleri kullanılmaktadır⁸. Ancak karaciğer ve böbrek dokusu kullanılarak yapılan IF testi, boyanma paternlerinin karakteristik olması nedeniyle daha sıklıkla tercih edilmektedir. Bu yöntemde tüm karaciğer lobülü homojen olarak boyanırken böbrek dokusunda sadece paroksimal tübül boyanmaktadır. Çalışmamızda da IF yöntemi kullanılmış ve IgG, IgA ve IgM tipi anti-LKM1 antikoları birlikte olmak üzere araştırılmıştır. Altı hastada saptanan anti-LKM pozitifliği 1/80 titrede pozitif bulunmuş ve ileri sulandırılarda pozitiflik saptanmamıştır. HCV enfeksiyonlarında saptanan otoantikor düzeylerinin, viral hepatit-otoimmün hepatit birlikteliğinde predominant karakterin saptanmasında ve tedavinin yönlendirilmesinde önemi olduğu ifade edilmektedir⁷.

Otoantikor pozitifliği saptanan HCV enfeksiyonlu hastalarda tedavinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Zira viral hepatitin tedavisinde kullanılan alfa interferon otoimmün hepatitin alevlenmesine yol açabileceği gibi otoimmün hepatitin

tedavisinde kullanılan immunosüpresif ilaçlar da viral replikasyonun artmasına neden olacaktır. Birçok çalışmada, anti-LKM pozitif HCV'li olgularda interferon tedavisine cevabın anti-LKM negatif olgulardan farklı olmadığı belirtilmekteyse de, bazı çalışmalar, anti-LKM1 pozitif kronik C hepatitli hastalarda interferon tedavisi sırasında akut atakların ortaya çıktığını ifade etmektedir.^{18,20,21,33} Dolayısıyla bu tip hastalarda LKM1 antikorlarının varlığı ve düzeyinin takibi yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda saptadığımız anti-LKM1 pozitiflik oranının (%6.9) çok yüksek olmamasına rağmen, C hepatiti sırasında otoimmün reaksiyonların takibinde, viral hepatit-otoimmün hepatit örtüşmesinin saptanmasında ve uygun tedavinin belirlenmesinde HCV enfeksiyonu olan hastalarda anti-LKM antikorlarının araştırılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Uzunalimoğlu Ö: Viral hepatitlerde ekstrahepatik sendromlar, s: 232-236. Viral Hepatit '98, K.Kılıçturgay (Ed), 1.Baskı, 1998, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayınları, Bursa.
2. Pietrogrande M, Corona M, Milani S, Rosti A, Ramella M, Tordato G: Relationship between rheumatoid factor and the immune response against hepatitis C virus in essential mixed cryoglobulinemia. Clin Exp Rheumatol 1995, 13: S109-113.
3. Cansas CW, Conn DR, Cjaza AJ, et al: Frequency and significance of autoantibodies to HCV in polyarthritis nodosa. J Rheumatol 1993, 20: 304-309.
4. Navas S, Bosch O, Castillo I, et al: Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: A retrospective study. Hepatology 1995, 21: 279-282.
5. Tanei R, Ohta Y, Katsnoka K: Lichen planus and Sjogren-type sicca syndrome in a patient with chronic hepatitis C. J Dermatol 1997, 24: 20-27.
6. Manns MP: Hepatotropic viruses and autoimmunity. J Viral Hepatitis 1997, 4(suppl.1): 7-10.
7. Kaymakoğlu S: Otoimmün hepatit, s: 390-405. Viral Hepatit '98, K.Kılıçturgay (Ed), 1.Baskı, 1998, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayınları, Bursa.
8. Leung PSC, Manns MP, Coppel RL, Gershwin ME: Detection of antimitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis and liver-kidney microsomal antibodies in autoimmune hepatitis, pp: 989-996. In: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (Eds), Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Fifth ed., 1997, Washington DC.
9. Durazzo M, Philipp TH, von Pelt FN, et al: Heterogeneity of microsomal autoantibodies (LKM) in chronic hepatitis C and D virus infection. Gastroenterology 1995, 108: 455-462.
10. Manns M, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF: Major target antigen of liver and kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis in cytochrome P450db1. J Clin Invest 1989, 83: 1066-1072.
11. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, et al: Chronic active hepatitis associated with liver-kidney microsome antibody type 1: a second type of autoimmune hepatitis. Hepatology 1987, 197: 1333-1339.
12. Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, et al: Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. Lancet 1990, 335: 258-259.
13. Bianchi FB: Autoimmune hepatitis: the lesson of the discovery of hepatitis C virus. J Hepatol 1993, 18: 273-275.

14. Lenzi M, Johnson PJ, McFarlane IG, et al: Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet* 1991, 338: 277-280.
15. Lunel F, Abuaf N, Frangeul L, et al: Liver-kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992, 16: 630-636.
16. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, et al: Evidence against hepatitis viruses as important causes of severe autoimmune hepatitis in the United States. *J Hepatol* 1993, 18: 342-352.
17. Clifford BD, Donahue D, Smith L, et al: High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995, 21: 613-619.
18. Fried MW, Draguesku JO, Shindo M, et al: Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 1993, 38: 631-636.
19. Abuaf N, Lunel F, Giral P, et al: Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *J Hepatol* 1993, 18: 359-364.
20. Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, et al: Interferon therapy in liver-kidney microsome antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994, 21: 199-203.
21. Calleja JL, Albillos A, Cacho G, Abreu L, Garrido A, Escartin P: Favorable response to interferon but not to prednisone in chronic hepatitis C with non-organ specific antibodies. *Gastroenterology* 1995, 108: A1043.
22. Bellary S, Schiano T, Leech S, Black M: Autoantibody expression in chronic hepatitis C and its lack of association with a specific HLA phenotype. *Gastroenterology* 1995, 108: A1033.
23. Bortolotti F, Vajro P, Balli F, et al: Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996, 25: 614-620.
24. Leri O, Paparo-Barbaro S, Sinopoli MT, Marcelli V, De Rosa FG, De Luca D: Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C viraemia. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996, 18: 3-6.
25. Michel G, Ritter A, Gergen G, et al: Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver disease. *Lancet* 1992, 339: 267-269.
26. Koşar Y, Tezel A, Oğuz P ve ark: Kronik viral hepatitlerde otoimmun serolojik göstergelerin prevalansı. *Gastroenteroloji* 1996, 7: 81-84.
27. Bayraktar Y, Bayraktar M, Gürakar A ve ark: A comparison of the prevalence of autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: The role of interferon in the development of autoimmune diseases. *Hepatogastroenterology* 1997, 44: 417-425.
28. Beşirbellioğlu AB, Görenek L, Gül HC, Hacıbekttaşoğlu A: Hepatit C virus enfeksiyonlu hastalarda otoantikör seroprevalansı. *Klinik Bilimler ve Doktor* 1998 (Baskıda).
29. Sayan M, Bahar İH, Abacıoğlu YH: Ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere karşı oluşan otoantikörlerin HCV-RNA ile ilişkisi: Preliminer bir çalışma. IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, 4-6 Kasım 1998, Ankara. Kongre Kitabı s: 176.
30. Ersöz G, Özer S, Dereli Y: Anti-HCV pozitif bireylerde otoimmun markerların araştırılması. IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, 4-6 Kasım 1998, Ankara. Kongre Kitabı s: 178.
31. Manns MP, Kruger M: Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1994, 106: 1676-1682.
32. Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, et al: Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998, 28: 1-7.
33. Todros L, Saracco G, Durazzo M, et al: Efficacy and safety of interferon alpha therapy in chronic hepatitis C with autoantibodies to liver-kidney microsomes. *Hepatology* 1995, 22: 1374-1378.