

Çeşitli kronik karaciğer hastalığı vakalarında T lenfosit subtiplerinin dağılımı

The distribution of T lymphocyte subtypes in cases with different chronic liver disease

Fulya İlhan¹, Sevgi Kalkanlı Taş², Hüseyin Ataseven³, Nalan Mirzai⁴, İ.Halil Bahçecioğlu⁵

ÖZET

Amaç: Hepatit B erişkinlerde %1-5 oranında kronikleşebilen siroz ve hepatosellüler karsinomaya neden olabilen önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Hepatit D ise HBsAg (+) kişilerde gelişen bir enfeksiyondur. Hepatit D virüsünün sitopatik etkili olduğu bilinmektedir ancak bu hastalığın gelişiminde rol oynayan immün mekanizmalar halen araştırılmaktadır. Bundan dolayı, bu çalışmada çeşitli kronik hepatit vakalarında lenfositlerin sayısal değişikliği olup olmadığını araştırmak amaçlandı.

Yöntemler: Bu çalışmada, kronik karaciğer hastalığı olan 12'si kadın 10'u erkek toplam 22 hasta değerlendirildi. Bu hastalar 12 kadın 8 erkekten oluşan, 20 kişilik sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubunun periferik kanlarında flow sitometrik yöntemle CD3, CD4, CD8, CD25, CD56, CD161 ve Vα24 monoklonal antikorları kullanılarak T lenfosit alt grupları araştırıldı.

Bulgular: Hastaların ve kontrol grubunun yaş ortalaması sırasıyla 45.87±11.18 yıl, 41.45±7.23 yıl idi. Hastaların biri hariç tümünde, HBsAg pozitif olarak bulundu. 15 hasta HBsAg yanı sıra Anti Delta pozitifliği de gösterdi. Bu hastaların; 6'sı kronik karaciğer hastalığı, 7'si karaciğer sirozu ve 2'si ise hepatoma tanısı ile izlenmekteydi. Total T lenfosit, CD4+ Th hücre ve CD3+CD56+ NKT hücreler ve Vα24+CD161+ NKT hücreler açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı. Ancak, CD8+ Tc, CD16+56+ NK hücreler ve CD4+CD25+ regülatör T hücre düzeylerinin, hastaların kanlarında kontrollere göre daha düşük olduğu saptandı.

Sonuç: Bu sonuçlar, HBsAg pozitifliğinin sitotoksik yanıtın sorumlu hücrelerdeki azalmaya neden olduğunu ima etmektedir. Ancak kronik hepatitteki immunolojik cevabı açıklayabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Kronik hepatit, total T lenfosit, CD4+ T hücre ve CD3+CD56+NKT.

ABSTRACT

Objective: Hepatitis B is an important infectious disease, which can cause severe chronic cirrhosis and hepatocellular carcinoma in 1-5 % of adult patients. Whereas, Hepatitis D is a defective virus infection that develops in people with HBsAg (+). It has been known that Hepatitis D virus has a cytopathic effect but the immune mechanisms which play a role in the development of this disease are still under investigation. Therefore, in this study it was aimed to investigate whether lymphocytes numbers change in a variety of patients with chronic hepatitis.

Methods: In this study, 22 patients (12 females and 10 males) with chronic liver diseases were examined. These patients were compared to the control group which consists of 20 healthy individuals (12 females, 8 males). A flow cytometry assay was conducted to examine T lymphocyte subgroups using CD3, CD4, CD8, CD25, CD56, CD161 and Vα24 monoclonal antibodies in peripheral blood samples of both patient and control groups.

Results: The mean age of patient group and control group were 45.87±11.18 and 41.45±7.23 year respectively. The HbsAg was found to be positive in all patients with the exception of one patient. 15 patients also exhibited Anti Delta Antigen positive as well as HbsAg. Six of these patients have been diagnosed with chronic liver disease, 7 of them have been diagnosed liver chrosis and two of them have been diagnosed with hepatoma. No difference was found between the patients and healthy controls in terms of total T lymphocyte, CD4+Th cells CD3+CD56+ NKT cells and Vα24+CD161+ iNKT cells. However, the levels of CD8+ Tc cells, CD16+56+ NK cells and CD4+CD25+ T lymphocytes were found to be lower in patients bloods as compared to the healthy controls.

Conclusions: These results suggest that HbsAg positivity may cause the decreases of the cells which are responsible for cytotoxic response. Nevertheless, further studies are required to explain the immunological response to the chronic hepatitis.

Key words: Chronic hepatitis, total T lymphocyte, CD4+ T cell and CD3+CD56+ NKT.

¹ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

³ Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bölümü, Konya, Türkiye

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bölümü, İzmir, Türkiye

⁵ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

Yazışma Adresi /Correspondence: Sevgi Kalkanlı Taş,

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Bölümü, Diyarbakır, Türkiye Email: sgkalkanli@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 11.03.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 28.03.2013

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2013, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

Hepatit B erişkinlerde %1-5 oranında kronikleşebilen siroz ve hepatosellüler karsinomaya neden olabilen önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Hepatit D ise HBsAg (+) kişilerde gelişen bir enfeksiyondur. Hepatit D virüsünün sitopatik etkili olduğu bilinmektedir ancak gelişiminde rol oynayan immün mekanizmaların neler olduğu halen araştırılmaktadır. Hücrel immün yanıt HBV proteinlerinin epitoplarına (özellikle Hbc Ag) karşı CD8+ sitotoksik T lenfositleri üzerinden meydana gelmektedir [1]. İmmün yanıtın gücü ve kalitesi enfeksiyonun doğal seyrinde majör belirleyici faktördür. Çeşitli viral proteinlere karşı immüntolerans etkin bir virüs temizliği oluşmasını engellemektedir. Ancak virüs temizliğinde pek etkili olamayan immün yanıt karaciğer hasarına yol açmaktadır. İmmün yanıtın kalitesi ve şiddetini belirleyen konak faktörleri hastalığın seyrinde önemli görünmektedir. Virüs-konak ilişkisi ve immün yanıt temelinde karanlık noktaların çözümlenmesi tedavide önemli bir rol oynayacaktır [2,3]. Bu çalışmada kronik hepatit vakalarında hücrel immün yanıtın nasıl şekillendiğini araştırmak amaçlandı.

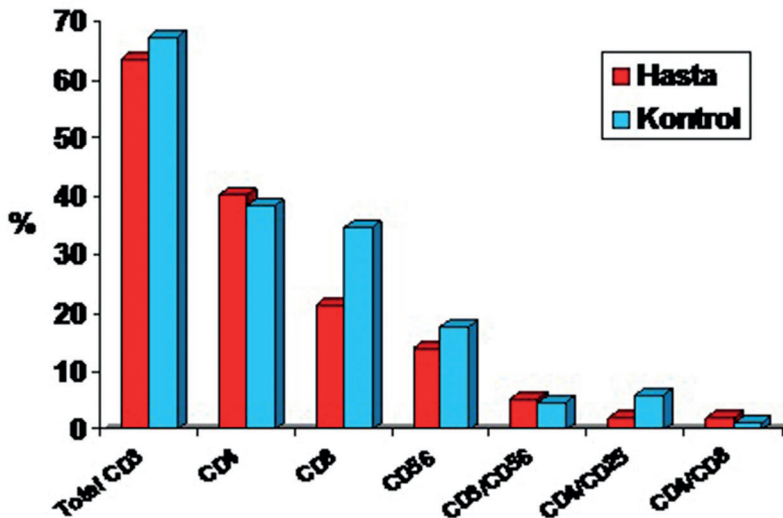
YÖNTEMLER

Çalışma kapsamında yaş ortalaması 45.87±11.18 yıl olan 12'si kadın 10'u erkek toplam 22 hasta değerlendirildi. Hastaların biri hariç tümünde HBsAg(+) idi. Bunlardan HBsAg yanı sıra HDVAg pozitifliği de saptanan 15 hastanın 6'sı kronik karaciğer hasta-

lığı, 7'si karaciğer sirozu ve 2'si ise hepatoma tanısı ile izlenmekteydi. Karaciğer sirozu olan 7 hastanın 6'sında sadece HBsAg (+)'liği saptanırken 1 hasta hepatit markerları yönünden negatif bulundu. Bu hastalar 12 kadın 8 erkekten oluşan, yaş ortalaması 41.45±7.23 yıl olan 20 kişilik sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubunun periferik kanlarında flow sitometrik yöntemle CD3, CD4, CD8, CD25, CD56, CD161 ve Vα24 monoklonal antikorları kullanılarak T lenfosit alt grupları araştırıldı. Flow sitometri için alınan kan örnekleri 2 saat içinde çalışıldı. Hücreler CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD56, CD16+56 monoklonal antikorları ile standart prosedür kullanılarak boyandı. Analitik flow sitometri Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coultere U.S.A) cihazı kullanılarak yapıldı. Toplam 10.000 hücre sayıldı. Gerekli voltaj ayarları yapılarak ve her hastada izotipik kontroller kullanılarak sonuçlar yorumlandı. Verilerin karşılaştırılması SPSS 11.0 versiyonu kullanılarak Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Önemlilik aralığı olarak p<0.05 kullanıldı.

BULGULAR

Total T hücreler, CD4+ Th hücreler, CD3+CD56+ NKT hücreler ve Vα24+CD161+ NKT hücreler açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı. CD8+, CD16+56+ NK hücreler ve CD4+CD25+ regülatör T hücrelerin ise hastalarda kontrollere göre düşük düzeylerde bulunduğu saptandı.



Şekil 1. Hasta ve kontrollerde T lenfosit oranları

Tablo 1. Hasta ve kontrollerde T lenfosit oranları (ortalama \pm SD)

	Hasta %	Kontrol %	P
Total CD3	63,60 \pm 5,95	67,31 \pm 6,35	p<0,05
CD4+ Th	40,19 \pm 49,04	38,50 \pm 4,63	p>0,05
CD8+ Tc	21,37 \pm 5,72	34,79 \pm 5,74	p<0,05
CD56+ NK	14,00 \pm 5,22	17,76 \pm 5,99	p<0,05
CD3 + CD56+ NKT	5,52 \pm 4,24	4,69 \pm 2,87	p>0,05
CD4 + CD25+ Treg	1,89 \pm 1,24	5,87 \pm 2,36	p<0,001
CD4+ Th/CD8+ Tc	1,94 \pm 0,70	1,14 \pm 0,31	p<0,05

TARTIŞMA

Treg hücreler otoimmün cevaptan korunmada önemli olan hücrelerdir. Kronik hepatitten otoimmün hepatite geçişte bu hücrelerin sayıca azalması rol oynayabilir. Kronik HCV enfeksiyonlu ve mikst kriyoglobülinemi gelişen semptomatik hastalarda Treg sayısında belirgin azalma saptanmıştır [4]. CD25+CD4+ Treg hücrelerin CD8+ sitotoksik T hücre cevabını negatif etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle de hücre içi parazitlere ve virüslere karşı immüнопатolojik ve koruyucu immün cevap Treg hücrelerden etkilenebilir. Bu sonuçlar, HBsAg pozitifliğinin sitotoksik yanıtta sorumlu hücrelerde azalmaya neden olduğunu ve immün regülasyonda önemli rolleri olan T regülatör hücrelerde izlenen bu azalmanın kronik hepatit gelişiminde veya hepatomaya gidişte rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Furuichi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada anti-CD25 mAb ile tedavi edilen farelerde DNA aşısının HBV-spesifik CD8+ T hücre cevabını artırdığı gösterilmiş ve Treg hücreleri azalan farelerde bu artan CD8 cevabının daha fazla hafıza hücre gelişimi ile sonlandığı gösterilmiştir [5]. CD161+ CD56+/-CD1d reaktif NKT hücrelerin hepatit modellerinde inflamatuvar yanıtı pozitif veya negatif yönde düzenledikleri gösterilmiştir [6]. Bir başka çalışmada invariant NKT hücrelerin kronik hepatitte progresif karaciğer hasarına cevap verebildiği ya da CD1d aracılığıyla lipit ligandlarla tetiklenerek ve IL-4, IL-13 gibi fibrozis ile ilgili sitokinleri salgılayarak karaciğer hasarına katkıda bulunabilecekleri gösterilmiştir [7,8]. Ayrıca CD1d sınırlı ancak alpha-GalCer'e reaksiyon vermeyen non-klasik NKT hücrelerinin hepatit B viral antijenlerini sunan hepatositlere

cevap vermede aktive oldukları gösterilmiştir. İnsan karaciğer dokusunda büyük oranda CD56+ NKT hücreler bulunurken iNKT'lerin az olduğu bulunmuştur [9]. Daha önceki bir çalışmada kronik HCV enfeksiyonu olan karaciğerlerde CD56+ T hücrelerde ve V α 24+ T hücrelerde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir [10]. Yine bir başka çalışmada sirotik karaciğerde azalmış CD56+ T hücre ve NK hücre sayısının hepatosellüler karsinomaya yakınlıkla ilgili olabileceği bildirilmiştir [11]. Bizim çalışmamızda da V α 24+CD161+ NKT hücrelerde yükselme saptanmamıştır. Bu hücrelerin periferik kandaki oranları %0.1'in altındadır ve kronik hepatitli hastalarda oranları sağlıklı kontrollerden farklı bulunmamıştır. Benzer olarak HCV enfeksiyonlu hastalarda yapılan bir başka çalışmada da V α 24/V β 11+ NKT hücrelerin 0.01-0.14% gibi çok düşük düzeylerde bulunduğu ve normal bireylerde de oranların buna benzerlik gösterdiği bildirilmiştir [12]. González ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, HCV enfekte hastalarda sirkülasyondaki non-iNKT hücrelerinde önemli bir artış gözlenirken iNKT hücrelerinde bir farklılığın gözlenmediği belirtilmiştir [13]. Hepatosellüler kanserli hastalarda hücresel cevapta bozulma ve immün fonksiyonlarda dengesizlik ortaya çıkabilir. Hücresel cevapta gelişen bu yetersizlik viral replikasyonu önleyemez hale gelir ve hastalık kronikleştikten sonra karaciğerdeki inflamasyon zamanla fibrozis ile sonuçlanır [14]. Bütün bulgular ortak olarak değerlendirildiğinde CD1d-reaktif T hücrelerin konağın çeşitli durumlarına göre karaciğerde koruyucu immün cevabın yanı sıra hasarlıya katkıda bulunabileceğini göstermektedir [15]. NKT hücreleri immün aracılı karaciğer hasarında karaciğerde pro ve anti-inflamatuvar cevaplar arasında bir denge unsurudur [16]. Alter ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın verileri, HCV enfeksiyonunun erken kontrol ve temizlenmesinde NK hücrelerinin özel bir popülasyonunu işaret etmektedir [17].

Hasta grubumuzu oluşturan kronik vakalarda ve hepatosellüler kanserde aktif hücresel immün cevabın yetersiz kalması dikkat çekicidir. İmmün faktörlerin değerlendirilmesi erken tanı veya prognoz değerlendirmesi açısından yararlı olabilir. Bu veriler doğrultusunda gerçekleştirilecek yeni ve daha kapsamlı çalışmalar konuya açıklık getirebilir.

KAYNAKLAR

1. Lucey DR, Clerol M, Shearer GM. Type I and type II cytokine dysregulation in human infections, neoplastic and inflammatory disease. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:532-564.
2. Milich DR, Schodel F, Hughes JL, et al. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell phenotype. *J Virol* 1997;71:2192-2201.
3. Çınar K. Hepatit B Virusunun immunopatogenezi. *Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri 2004*: sayfa 57-64.
4. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemiavasculitis. *Blood* 2004;103:3428-3430.
5. Furuichi Y, Tokuyama H, Ueha S, et al. Depletion of CD25+CD4+T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8+ T cell response primed by DNA immunization. *World J Gastroenterol* 2005;28:3772-3777.
6. Durante-Mangoni E, Wang R, Shaulov A, et al. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resi-dent proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J Immunol* 2004;173:2159-2166.
7. de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, et al. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis pro-gression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* 2004;173:1417-1425.
8. Baron JL, Gardiner L, Nishimura S, et al. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 2002;16:583-594.
9. Exley MA, He Q, Cheng O, et al. Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus infected liver. *J Immunol* 2002;168:1519-1523.
10. Deigman T, Curry MP, Doherty DG, et al. Decrease in hepatic CD56+ T cells and V α 24+ natural killer T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2002;37:101-108.
11. Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, et al. Decrease of CD56+ T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;32: 962-969.
12. Nuti S, Rosa D, Valiante N, et al. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for V α 24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol* 1998;28: 3448-3455.
13. González LR, Conesa A, Blanca I, et al. Increased number of non-invariant NKT cells and low number of circulating CD1-expressing leukocytes in patients infected with hepatitis C virus. *Ann Biol Clin (Paris)* 2012 ;70:695-701.
14. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *TrendsMicrobiol* 2004;12:96-102.
15. Okumura A, Ishikawa T, Maeno T, et al. Changes in natural killer T cells subsets during therapy in type C hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2005;32:213-217.
16. Swain MG. Natural killer T cells within the liver: conductors of the hepatic immune orchestra. *Dig Dis* 2010;28:7-13.
17. Alter G, Jost S, Rihn S, et al. Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatology* 2011;55:278-288.