

Tadeusz Wojciech Łapiński, Magdalena Rogalska-Płońska, ¹Jolanta Czajkowska,
Robert Flisiak

WPLYW KRIOGLOBULINEMII NA FUNKCJĘ NEREK WŚRÓD OSÓB PRZEWLEKLE ZAKAŻONYCH HCV

INFLUENCE OF CRYOGLOBULINAEMIA ON RENAL FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HCV INFECTION

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: Robert Flisiak

¹Laboratorium Diagnostyczne Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Białymstoku
Kierownik: Jolanta Czajkowska

STRESZCZENIE

Zakażenie HCV często jest przyczyną krioglobulinemii charakteryzującej się obecnością w surowicy immunoglobulin ulegających krioprecypitacji w niskich temperaturach. Odkładanie się krioprecypitatów w naczyniach kłębuszków nerkowych może spowodować rozwój błoniastego, rzadziej mezangialnego ich zapalenia i w konsekwencji doprowadzić do niewydolności nerek.

Celem badań była ocena wśród przewlekle zakażonych HCV obecności i rodzaju krioglobulin oraz wpływ tej patologii na czynność nerek.

Chorzy i metody. Badaniami objęto 36 chorych (9 kobiet i 27 mężczyzn) w wieku, średnio 38 lat, przewlekle zakażonych HCV.

Obecność i rodzaj krioglobulin określano w surowicy metodą elektroforezy, a następnie immunofiksacji na kriożelu metodą Bence Jones (Sebia, Francja). Funkcję nerek oceniono na podstawie stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy, wielkości przesączania kłębuszkowego (GFR) oraz stężenia w surowicy cystatyny C metodą immunoenzymatyczną.

Wyniki. Krioglobulinemia występowała znamiennej częściej wśród zakażonych genotypem 1 niż 3 (71% vs. 39%; $p < 0,05$). Częstość występowania krioglobulinemii typu II i III była porównywalna. Spośród łańcuchów ciężkich, najczęściej wykrywano immunoglobuliny klasy gamma (42%), a z lekkich kappa (54%). Stężenia mocznika i kreatyniny były prawidłowe u wszystkich chorych. Nieprawidłowy GFR wykazano u 3 chorych z rozpozną krioglobulinemią, zakażonych genotypem 1. Podwyższone stężenie cystatyny C korelowało z występującą krioglobulinemią ($R=0,4$; $p < 0,013$).

ABSTRACT

HCV infection is a common cause of cryoglobulinaemia, characterized by existence of antibodies that show reversible precipitation at low temperatures. Deposition of cryoglobulines in glomerular vessels tends to induce development of membranous, or less commonly, mesangial glomerulonephritis with renal insufficiency as final consequence.

Objective was investigating the existence of cryoglobulinaemia, its types and relation with renal impairment in patients chronically infected with hepatitis C virus.

Methods. The research included 36 patients (9 women and 27 men) chronically infected with hepatitis C virus at the average age 38 years.

Existence and types of cryoglobulines in serum were measured using electrophoresis and then immunofixation on cryogel by the method of Bence Jones (Sebia, France). Renal functioning was estimated with reference to serum urea and creatinine concentrations, glomerular filtration rate (GFR) and serum cystatin C concentration with immunoenzymatic method.

Results. Cryoglobulinaemia was significantly more common among patients infected with genotype 1 than 3 (71% vs. 39%; $p < 0,05$). Types II and III of cryoglobulinaemia existed in equal frequency. The most common heavy chains were gamma immunoglobulins (42%) and the light ones – kappa (54%). Urea and creatinine concentration were normal in all patients. Three patients diagnosed with cryoglobulinaemia and infected with genotype 1 had abnormal GFR. There was dependency between cryoglobulinaemia and elevated cystatin C concentration ($R=0,4$; $p < 0,013$).

Wnioski. Krioglobulinemia w zakażeniu HCV częściej występuje wśród zakażonych genotypem 1 niż 3. Rutynowe badania czynności nerek są niewystarczające w ocenie zagrożenia funkcji nerek u chorych z krioglobulinemią. Celowe jest więc oznaczanie stężenia cystatyny C jako czułego i wczesnego testu wskazującego na rozpoczynające się uszkodzenie nerek.

Słowa kluczowe: HCV, krioglobulinemia, uszkodzenie nerek

WSTĘP

Przewlekłe zakażenie HCV stymuluje limfocyty B do proliferacji oraz wzmożonej syntezy immunoglobuliny. Stan taki sprzyja powstawaniu nieprawidłowych immunoglobulin, takich jak krioglobuliny. W zakażeniu HCV krioglobulinemia występuje u ponad 50% chorych (1). Krioglobuliny ulegają krioprecypitacji w przypadku obniżenia temperatury ciała o około 5°C. Krioglobulinemia jest najczęściej bezobjawowa, ale może objawiać się zmianami zapalnymi w małych naczyniach skóry, stawach, polineuropatią obwodową i uszkodzeniami nerek (2, 3). Odkładanie się krioprecypitatów w naczyniach kłębuszków nerkowych może spowodować rozwój błoniastego, rzadziej mezangialnego ich zapalenia i w konsekwencji doprowadzić do niewydolności nerek. Zakażenie HCV stymuluje rozwój krioglobulinemii typu II charakteryzującej się występowaniem immunoglobulin monoklonalnych typu M lub A i poliklonalnych typu G, lub krioglobulinemii typu III, cechującej się obecnością tylko poliklonalnych immunoglobulin typu M, G lub A.

CEL BADAŃ

Podjęto badania oceniające obecność i rodzaj krioglobulin występujących wśród zakażonych HCV. Określono zależność ich występowania w odniesieniu do genotypu HCV i wirerii. Ponadto oceniano wpływ krioglobulinemii na czynność nerek.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 36 chorych przewlekłe zakażonych HCV (9 kobiet i 27 mężczyzn) w wieku, średnio 38 (SD ±13) lat. Wśród badanych wyodrębniono dwie grupy, po 18 chorych zakażonych genotypem 1 i genotypem 3 HCV.

Żadna z osób badanych nie chorowała aktualnie i w okresie sześciu miesięcy poprzedzających badanie na przewlekłe uszkodzenie nerek lub zakażenie układu

Conclusions. Cryoglobulinaemia were more frequently in patients infected genotype 1 than genotype 3 HCV. Routine tests of renal functioning are insufficient in estimating the risk of renal failure in patients with cryoglobulinaemia. This is the reason to measure cystatin C concentration as a sensitive and primary test that indicates developing renal impairment.

Key words: HCV, cryoglobulinaemia, renal failure

moczowego. Badania przeprowadzono u zakażonych HCV zakwalifikowanych do leczenia przeciwwirusowego w okresie poprzedzającym terapię interferonem alfa i rybawiryną.

Zakażenie HCV stwierdzono na podstawie wykrycia w surowicy krwi przeciwciał anty HCV metodą immunoenzymatyczną (ABBOTT, USA), oraz obecności HCV-RNA i jego genotypu metodą RT-nested - PCR (Syngen Biotech, USA). Wykonywany test pozwalał na wykrycie w 1 ml krwi, 100 kopii wirusów HCV (Badanie wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej, AM w Białymstoku, Kierownik: prof. dr hab. Lech Chyczewski).

Wszyscy chorzy w okresie kwalifikacji do leczenia przeciwwirusowego mieli wykonywaną biopsję wątroby. Stan morfologiczny wątroby określano zgodnie z klasyfikacją Scheuera (Badanie wykonał dr hab. Anatol Panasiuk w Klinice Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku) (4).

Obecność i rodzaj krioglobulin określano w surowicy metodą elektroforezy, a następnie immunofiksacji na kriożelu metodą Bence Jones (Sebia, Francja), (5).

Funkcję nerek oceniono na podstawie stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy, wielkości przesączania kłębuszkowego (GFR) oraz stężenia w surowicy cystatyny C metodą ELISA (BioVendor GmbH, Niemcy).

Grupę kontrolną, w której oceniano obecność krioglobulin i stężenie cystatyny C, stanowiło 16 osób: 9 kobiet i 7 mężczyzn w wieku średnio 38 (S.D. ±12) lat.

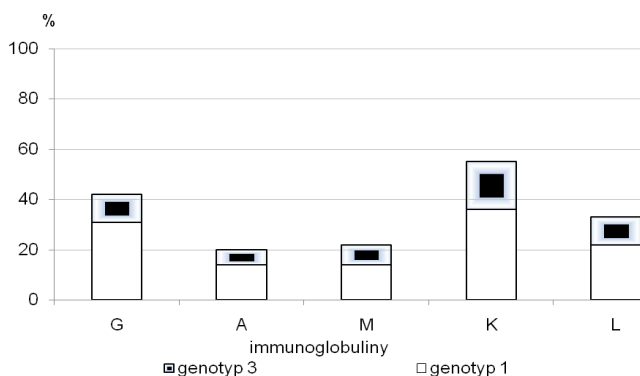
Analizę statystyczną przeprowadzono używając testów U Manna – Whitneya, Spearmana i Chi-kwadrat (χ^2). Poziom istotności określono w przypadku $p < 0,05$.

Po uprzednim zaakceptowaniu badania przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku chorzy oraz osoby z grupy kontrolnej wyrazili świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniach. .

WYNIKI

W surowicy osób zdrowych z grupy kontrolnej nie stwierdzono krioglobulin, zaś stężenie cystatyny C wynosiło 392 ± 50 ng/ml.

Obecność krioglobulin wykazano u 20/36 (56%) chorych, 6/9 (67%) kobiet i 14/27 (52%) mężczyzn. U 12 (34%) chorych była to krioglobulinemia typu II, a u 8 (22%) typu III. Analizując częstość występowania w krioglobulinach poszczególnych łańcuchów, najczęściej wykrywano spośród łańcuchów ciężkich immunoglobuliny klasy gamma 18/36 (42%), a z lekkich kappa 20/36 (54%), (Ryc. 1).



Rycina 1. Częstość występowania poszczególnych immunoglobulin w surowicy chorych z przewlekłym zakażeniem HCV.

Figure 1. Frequency of individual immunoglobulines occurrence in serum patients with HCV infection.

Krioglobulinemia występowała znacząco częściej wśród zakażonych genotypem 1 niż 3 (13/18; 72% vs. 7/18; 39%; $\chi^2=4,05$; $p<0,05$). Nie obserwowano zależności pomiędzy wirémią a występowaniem krioglobulinemii.

Oceniając zmiany histopatologiczne w wątrobie w odniesieniu do krioglobulinemii stwierdzono, że aktywność zmian zapalnych u osób z krioglobulinemią w porównaniu do chorych bez krioglobulinemii ($G=2,5$ vs. $G=2,4$) oraz włóknienie ($S=1,25$ vs. $S=1,25$) są porównywalne.

Określone u wszystkich badanych stężenie mocznika i kreatyniny były prawidłowe. Wielkości przesączania kłębuszkowego było prawidłowe u 33 z 36 chorych. Trzy osoby z wartościami GFR poniżej 89, wskazującymi na utajone uszkodzenie nerek, były zakażone genotypem 1 HCV, a w ich surowicy wykryto krioglobuliny.

Stwierdzono wyższe stężenie cystatyny C w surowicy wśród zakażonych HCV w porównaniu do grupy kontrolnej, ale wzrost ten nie był statystycznie istotny. Znacząco wyższe stężenia cystatyny C obserwowano u chorych z krioglobulinemią (678 ± 545 ng/ml),

w porównaniu z grupą chorych bez krioglobulinemii (270 ± 345 ng/ml; $z=2,42$, $p<0,015$), (Tab.1).

Podwyższone stężenie cystatyny C stwierdzano u 17/36 (47%) chorych: u 10 (28%) zakażonych genotypem 1 i u 7 (19%) genotypem 3. Spośród 20 chorych z krioglobulinemią u 12 stwierdzono podwyższone stężenie cystatyny C. Obserwowano znaczącą korelację pomiędzy występowaniem krioglobulinemii a podwyższonym stężeniem cystatyny C w surowicy ($R=0,4$; $t=2,61$, $p<0,013$).

Tabela I. Stężenie cystatyny C w surowicy badanych chorych

Table I. Concentration of cystatin C in serum among examination patients

	n	średnia (ng/ml)	\pm S.D. (ng/ml)
grupa kontrolna	16	392	50
wszyscy chorzy	36	497	504
chorzy bez krioglobulinemii	16	270	345
chorzy z krioglobulinemią	20	678	545

DYSKUSJA

U pacjentów z przewlekłym wzv typu C dochodzi do wzrostu w surowicy krwi czynnika stymulującego limfocyty B (*B-lymphocyte activating factor*, BAFF/BLyS), który nasila produkcję immunoglobulin, ale również aktywuje procesy autoimmunologiczne (6). Potwierdzeniem tego w naszych badaniach jest wykazanie częstego, bo aż u 54% chorych występowania krioglobulin. Wyniki badań własnych są zbliżone do wyników uzyskanych przez Jabłońską i Ząbek, którzy w grupie 35 zakażonych HCV, u 51% wykazali krioglobulinemię (3). Krioglobuliny są syntetyzowane głównie przez limfocyty B, klon VH1-69. Działający na te limfocyty czynnik BAFF nie tylko stymuluje syntezę immunoglobulin, ale również hamuje apoptozę tych komórek. Nieznany jest mechanizm działania HCV na limfocyty powodujący stymulację syntezy poszczególnych łańcuchów immunoglobulin (7). Z tego też powodu niejasne jest występowanie wśród chorych z krioglobulinemią często krioglobulin ciężkich G (89%) i lekkich K (100%) i rzadkie, krioglobulin ciężkich M (37%) i lekkich L (58%).

Cacoub i wsp. (8) wykazali częstsze występowanie krioglobulinemii u kobiet oraz u osób z wieloletnim okresem zakażenia HCV. Nasze badania wydają się potwierdzać zwiększone ryzyko występowania krioglobulinemii wśród kobiet.

W badaniach Saadoun i wsp. (9) wykazano częstsze występowanie krioglobulinemii wśród chorych z nasileniem zmian histopatologicznych w wątrobie. Wyniki naszych badań nie potwierdzają tych obserwacji. Wydaje się, że zarówno aktywność zmian zapalnych,

jak i nasilenie włóknienia nie korelują z występowaniem krioglobulinemii.

Stwierdzenie zamiennie częstszego występowania krioglobulinemii wśród chorych zakażonych genotypem 1 HCV jest istotne z punktu widzenia klinicznego, ale również wskazuje na kolejne, istotne różnice aktywności genotypów 1 i 3 HCV.

Oznaczanie mocznika i kreatyniny jak również GFR wśród chorych z krioglobulinemią jest niewystarczające do oceny czynności nerek. Coraz częściej do wczesnej oceny zaburzenia czynności nerek wykorzystywana jest ocena stężenia cystatyny C w surowicy (10, 11). Jest to bardzo przydatny test określający wczesne uszkodzenie nerek u chorych z krioglobulinemią. Potwierdziły to nasze badania, w których wykazano korelację pomiędzy stężeniem cystatyny C a krioglobulinemią.

Problem krioglobulinemii wśród chorych przewlekle zakażonych HCV jest istotny ponieważ zmniejsza skuteczność terapii przeciwwirusowej (12). Wiadome jest, że na limfocytach B występuje błonowy receptor CD20 aktywujący procesy programowanej śmierci tych komórek. Pobudzenie tego receptora przez monoklonalne przeciwciała wykorzystywane obecnie w leczeniu krioglobulinemii, teoretycznie może wpłynąć na poprawienie skuteczności terapii (13).

Problem krioglobulinemii w zakażeniu HCV wskazuje na istotny wpływ wirusów na limfocyty B. Jest to ważne ponieważ te same limfocyty mogą ulec przekształceniu w komórki chłoniaków typu nie-Hodgkin, przewlekłej białaczki limfocytarnej, chłoniaków limfatyczno-plazmatycznych oraz chłoniaków zbudowanych z dużych komórek B (14).

WNIOSKI

Krioglobulinemia w zakażeniu HCV częściej występuje w zakażeniu genotypem 1 niż 3. Rutynowe badania czynności nerek są niewystarczające w ocenie zagrożenia ich funkcji wśród chorych z krioglobulinemią. Celowe jest określanie stężenia cystatyny C wśród chorych z krioglobulinemią, która może wskazywać na rozpoczynające się uszkodzenie nerek.

PIŚMIENNICTWO

- Cacoub P, Fabiani FL, Musset L, Perrin M, Frangeul L, Leger JM, Hureau JM, Piette JC, Godeau P. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am J Med* 1994;96:124-132.
- Yagi H, Takahashi N, Yamaguchi Y, Kato K. Temperature-dependent isologous Fab-Fab interaction that mediates cryocrystallization of a monoclonal immunoglobulin G. *Mol Immunol* 2004;41:1211-1215.
- Jabłońska J, Zabek J. Nowe wykładniki autoagresji wobec ślinianek i stawów u osób zakażonych HCV. *Przegl Epidemiol* 2005;59:439-446.
- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-376.
- Le Carrer D. Cryoglobulinemia. In: Serum protein, electrophoresis, immunofixation. Le Carrer D, FM-BIO, Vanves, Bagneux, 2005;7:91-121.
- Toubi E, Gordon S, Kessel A, Rosner I, Rozenbaum M, Shoenfeld Y, Zuckerman E. Elevated serum B-Lymphocyte activating factor (BAFF) in chronic hepatitis C virus infection: association with autoimmunity. *J Autoimmun* 2006;27:134-139.
- Schott P, Hartmann H, Ramadori G. Hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. Clinical manifestations, histopathological changes, mechanisms of cryoprecipitation and options of treatment. *Histol Histopathol* 2001;16:1275-1285.
- Cacoub P, Sène D, Saadoun D. Cryoglobulinemia. *Rev Med Interne* 2008;29:200-208.
- Saadoun D, Asselah T, Resche-Rigon M, Charlotte F, Bedossa P, Valla D, Piette JC, Marcellin P, Cacoub P. Cryoglobulinemia is associated with steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;43:1337-1345.
- Mazur MJ, Heilman RL. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C: a new opportunity for a hepatologist. *Liver Transpl* 2005;11:705-707.
- Jaroszewicz J, Wiercińska – Drapała A, Łapiński TW, Prokopowicz D, Rogalska M, Parfieniuk A. Does HAART improve renal function? An association between serum cystatin C concentration, HIV viral load, and HAART duration. *Antiviral Therapy* 2006;11:641-645.
- Scotto G, Campanozzi F, D'Adduzio A, Fazio V. Efficacy of alpha interferon treatment in patients with chronic hepatitis C associated to mixed cryoglobulinaemia. *Infez Med* 2000;8:216-221.
- Pischke S, Cornberg M, Manns MP. Hepatitis associated cryoglobulinemia. *Internist (Berl)* 2008;49:297-304.
- Viswanatha DS, Dogan A. Hepatitis C virus and lymphoma. *J Clin Pathol* 2007;60:1378-1383.

Otrzymano: 9.10.2008 r.

Zakwalifikowano do druku: 14.01.2009 r.

Adres do korespondencji:

Tadeusz Wojciech Łapiński,
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny
im. K Dłuskiego w Białymstoku
15 - 540 Białystok, ul. Żurawia 14
tel./fax (48 - 85) 7- 41 - 69 - 21
e-mail: twlapinski@wp.pl