

ХРОНИЧНА ХЕПАТИТ С-ВИРУСНА ИНФЕКЦИЯ И ЛИМФОМИ

Д. Петрова¹, Е. Хаджиев², Св. Христова³, Е. Наумова⁴, А. Михайлова, А. Цветанска⁵ и К. Чернев¹

¹КПВБ, Клиника по гастроентерология,

²Клиника по хематология,

³Катедра по патологична анатомия,

⁴Централна лаборатория по клинична и трансплантационна имунология, МБАЛ „Александровска”,

⁶Вирусологична лаборатория, Институт по педиатрия,

Медицински Университет – София

Резюме. При 8.8% от болните с хронична HCV инфекция се установяват В-клетъчни неходжкинови лимфоми. Те се срещат по-често при по-възрастни жени, заразени чрез кръвопреливане в миналото. Честотата на лимфомите достига 17.6% при болните с криоглобулини, докато при тези без криоглобулини тя е 3.5% и не се различава значимо от наблюдаваната в общата популация. Пациентите с криоглобулини следва да се проследят за развитие на В-клетъчен неходжкинов лимфом, особено при наличието на лимфаденомегалия, изразена спленомегалия, намален брой на В-лимфоцитите от флуоцитометричния анализ и съпътстващи автоимунни феномени.

Ключови думи: хепатит С, лимфом, криоглобулини

D. Petrova, E. Hadhiev, Sv. Hristova, E. Naumova, A. Mihaylova, A. Tsvetanska and K. Chernev. CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION AND LYMPHOMA

Summary. Non-Hodgkin's B-cell lymphomas were found in 8.8% of patients with chronic HCV infection. Non-Hodgkin's B-cell lymphomas were predominantly found in older women, who were infected by blood transfusions in the past. The prevalence of lymphomas increased to 17.6% in the cryoglobulin-positive patients, whereas in the cryoglobulin-negative ones their prevalence (3.5%) did not differ significantly from the prevalence of lymphomas in the general population. The HCV patients with cryoglobulins should be seek for the development of lymphoma, especially in the presence of lymphadenomegaly, extreme splenomegaly, low B-lymphocyte count, and autoimmune phenomena.

Key words: hepatitis C, lymphoma, cryoglobulins

През 1990 г. Pascual и сътр. наблюдават двама болни с хронична хепатит С-вирусна (HCV) инфекция и смесена криоглобулинемия и първи изказват предположението за възможна връзка между двете заболявания [20]. Между 5 до 10% от болните с HCV-асоцирана криоглобулинемия развиват клинично и хистологично потвърдени неходжкинови В-клетъчни лимфоми [1, 7, 22, 23]. Zignego и сътр. установяват маркери за инфекция с HCV (anti-HCV и HCV-RNA) при 32% от пациентите с “идиопатичен” неходжкинов лимфом и при 90% от тези със смесена криоглобулинемия и съпътстващ неходжкинов лимфом [24]. Повечето болни са с 2a/3 генотип. В същото проучване HCV-RNA е установена в 81% от перифернокръвни мононуклеарни клетки [24]. Предполага се, че инфекцията и/или продължителната антигенна стимулация на В-лимфоцитите в

хода на хроничната инфекция с HCV може да доведе до t(14;18) транслокация в bcl-2 гена на 18q21 хромозомата, последвано от блокиране на процесите на апоптоза и клонална В-клетъчна лимфопрлиферация с преход в В-клетъчен неходжкинов лимфом [25, 26]. Преходът от бенигна лимфопрлиферация (криоглобулинемия) към злокачествено лимфопрлиферативно заболяване (неходжкинов лимфом) изисква продължителен период от време (средно около 62 месеца) [1, 21, 22]. Ferri и сътр. описват 231 болни с хепатит С и смесена криоглобулинемия, от които 20 (приблизително 12%) развиват В-клетъчен лимфом в период на проследяване от 8.8 години [7].

Злокачествените лимфопрлиферативни заболявания са най-често срещаните неоплазми при болните с HCV-асоцирана криоглобулине-

мия [18]. Най-честите хистологични типове по REAL/WHO класификацията са лимфоплазмозитоидният лимфом (29%); дифузният лимфом, представен от големи В-лимфоцити (27%); фоликуларният лимфом (16%); маргиналният лимфом (10%) и мантелноклетъчният лимфом (7%) [22]. Маркери за инфекция с HCV (анти-HCV и HCV-RNA) се установяват при над 42% от болните с неходжкинови лимфоми в Средиземноморския район и Япония [19, 23], докато в Северна Европа честотата на инфекцията е много ниска (< 1%) и не се различава от тази в общата популация [15]. Наличието на географски и етнически различия е потвърдено от Североамериканско проучване при натурализирани испанци с неходжкинови лимфоми в САЩ, при което се установява по-висока честота на HCV инфекция в испанската популация (22%), спрямо 4.5% в контролна група от бялата раса без испански произход [27].

Увеличените лимфни възли са честа находка при болните с HCV инфекция [6]. Лимфаденомегалията корелира с нивото на вирусно натоварване, но не и с тежестта на чернодробното увреждане [2, 8]. Негативнозаредени вериги от HCV-RNA се установяват в повече от 60% от лимфните възли при болни с HCV + HIV коинфекция, което показва, че HCV инфекцията се поддържа в заразени лимфоидни клетки извън черния дроб [14]. Характерно за лимфомите при инфекция с HCV е засягането на слюнчените жлези, костния мозък и черния дроб [3, 4]. Лимфоидните фоликули в черния дроб и костния мозък при болните с хепатит С се приемат от някои автори за "ранен лимфом", тъй като изграждащите ги клетки имунохистохимично не се различават от малигнените клетки при имуоцитомата (Ic) и лимфома, изграден от малки лимфоцити (B-CLL) [9, 16, 17]. Лимфоидните агрегати остават непроменени дълги години, но могат да прерастнат в истински лимфоидни тумори при около 10% от случаите [10, 17]. Тези особености водят до обособяването на нов тип увреждане от HCV, наречено монотипно лимфопролиферативно нарушение с неясно значение (monotypic lymphoproliferative disorder of undetermined significance – MLDUS) [9, 12].

ЦЕЛ

Като изхождахме от наличните данни, ние си поставихме за цел за проучим честотата и особеностите в клиничното протичане при болни с HCV-асоциирани В-клетъчни неходжкинови лимфоми.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В-клетъчните неходжкинови лимфоми, клиничнолабораторната им конституция и някои фактори, свързани с наличието им, бяха проучени при 136 болни с хронична HCV инфекция, постъпили за диагностично уточняване, проследяване и лечение в Клиниката по гастроентерология. Всички пациенти са проследени и за други клинични и биологични екстрахепатални прояви на хроничната HCV инфекция. Проучените екстрахепатални клинични прояви включват умора, сърбеж, артралгии, парестезии, пурпура, бъбречно увреждане, лимфаденомегалия, спленомегалия. Проучените биологични прояви включват дисбаланс в лимфоцитните субпопулации, автоантитела, криоглобулини.

Хроничната HCV инфекция е установена въз основа на наличието на anti-HCV антитела (ELISA), а вирусното натоварване и генотипът са определени с PCR (Monitor HCV Test, Roche). Наличието на В-клетъчни неходжкинови лимфоми е потвърдено в Клиниката по хематология на МБАЛ „Александровска“ – София, а хистологичното им потвърждаване – в Катедрата по патологоанатомия на Медицинския университет – София. Имунофенотипизирането на лимфоцитните популации от периферна венозна кръв е извършено флуориметрично (Cytometer: FACSCalibur, E0141, Software: SimulSET v. 3.0) в Централната лаборатория по клинична и трансплантационна имунология на МБАЛ „Александровска“. Изследвани са: общи (CD3+) Т-лимфоцити, хелперно/индусерни (CD3+4+) Т-клетки, супресорно/цитотоксични (CD3+8+) Т-клетки, натурални килъри (CD3-16+56+) NK, Т и/или NK (CD57+CD8-), Т и/или NK (CD57+CD8+) клетки, активирани Т-лимфоцити (CD3+HLADR+) и В-лимфоцити (CD19+). Наличието на органонеспецифични автоантитела (ANA, AMA, SMA, ANCA) е установено с индиректна имуофлуоресценция (IFA/ Binding Site). Криоглобулините са изследвани по метода на Winfield и сътр.

Проучени са връзките на HCV-асоциираните лимфоми с някои епидемиологични и демографски фактори, хистологичните промени в черния дроб, вирусното натоварване и генотипа. Вирусното натоварване е прието за високо при HCV-RNA над 800 000 IU/ml и за ниско при HCV RNA ≤ 800 000 IU/ml [5]. Проучени са и връзките на HCV-асоциираните лимфоми с други клинични и биологични екстрахепатални прояви на хроничната HCV инфекция. Епидемиологичните и демографските данни включват пол, възраст, начин на заразяване (кръвопреливане, интравенозно прилагане на наркотици, оперативни ин-

тервенции и др.), давност на инфекцията. Тежестта на некроинфламацията и степента на фиброобразуване в черния дроб са оценени хистологично по Metavir [11]. Възпалението е оценено по 4-степенна скала (A0 – няма хистологична активност, A1 – лека, A2 – умерена, A3 – изразена некроинфламаторна активност); а фиброобразуването – по 5-степенна скала (F0 – няма фиброза, F1 – портална фиброза без септообразуване, F2 – няколко септи, F3 – множество септи без цироза, F4 – цироза).

Всички проучвани данни се отнасят към периода преди започване на специфично антивирусно лечение и/или химиотерапия.

Статистическата обработка на данните е извършена с компютърна статистическа програма SPSS, v.12. Количествените данни са оценени със Student's t-тест, качествените – с χ^2 и екзактният тест на Fisher, връзките между проучваните явления са оценени с еднофакторен логистично-регресионен анализ.

РЕЗУЛТАТИ

Епидемиологичните и демографските данни, вирусното натоварване и генотипът при изследваните болни са представени на табл. 1.

При 12 от 136 пациенти (8.8%) с хронична HCV инфекция установихме наличие на лимфоми (фиг. 1).

Връзките между наличието на лимфоми и някои епидемиологични и демографски фактори, вирусното натоварване и генотипа, както и хистологичната активност в черния дроб, са представени на табл. 2.

Таблица 2. Рискови фактори, свързани с наличието на лимфоми при болните с хронична HCV инфекция

Рискови фактори	Без лимфом n 124 (%)	С лимфом n 12 (%)	P*	OR	95% CI
Давност на инфекцията > 20 години	40 (32.3)	6 (50.0)	NS		
Заразяване чрез кръвопреливане	41 (33.1)	9 (75.0)	0.009	6.0	1.5-23.6
Цироза (Metavir F4)	50 (40.3)	5 (41.7)	NS		
Възраст в години	49 ± 16	55 ± 11	NS		
Женски пол	64 (51.6)	10 (83.3)	0.05	4.6	1.0-22.0
Висока некроинфламаторна активност	34 (27.4)	3 (25.0)	NS		
Генотип 1	49 (86.0)	3 (100.0)	NS		
Високо вирусно натоварване	36 (63.2)	3 (100.0)	NS		

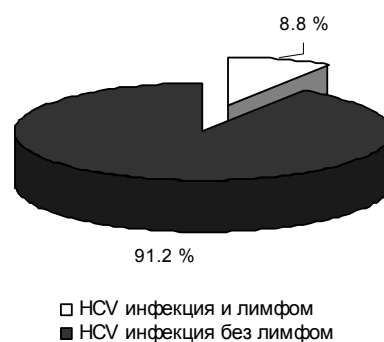
Екзактен тест на Fisher и χ^2 ;

*достоверна разлика при $p < 0.05$, NS – липсва статистическа достоверност, OR – отношение на риска, CI – доверителен интервал

При 51 от изследваните 136 болни (37.5%) установихме наличие на криоглобулини. При болните с криоглобулини честотата на лимфомите достига 17.6%, докато при тези без криоглобулини е 3.5% (табл. 3). При клиничното проследяване 3

Таблица 1. Епидемиологични, демографски данни, вирусно натоварване и генотип при изследваните болни

		%
Пол	Мъже	45.6
	Жени	54.4
Възраст	< 60 години	66.2
	≥ 60 години	33.8
Възраст в години	Средна ± SD (от 20 до 80)	
Начин на заразяване	Кръвопреливане	36.8
	Наркомани	14.7
	Оперативни интервенции	35.3
	Друг	13.2
Давност на инфекцията	до 5 години	16.9
	5+10 години	13.2
	10+15 години	9.4
	15+20 години	9.0
	≥ 20 години	51.5
Генотип	1	84.0
	3	8.0
	смесен	8.0
HCV-RNA	> 800 000 IU/ml	65.0
HCV-RNA	≤ 800 000 IU/ml	35.0



Фиг. 1. Пациенти с HCV инфекции и съпътстващ лимфом

възрастни жени с чернодробна цироза, заразени чрез кръвопреливане при тежко раждане в миналото, развиха криоглобулинемия и впоследствие В-клетъчен неходжкинов лимфом, съответно в период на проследяване от 2, 3 и 5 години.

Таблица 3. Честота на лимфомите при болни с HCV криоглобулинемия

	Крио (-) n = 85 n (%)	Крио (+) n = 51 n (%)	p*	OR	95%CI
Лимфом	3 (3.5)	9 (17.6)	0.01	5.8	1.5-22.7

Екзактен тест на Fisher и χ^2 ;

* достоверна разлика при $p < 0.05$, **NS** – липсва статистическа достоверност, **OR** – отношение на риска, **CI** – доверителен интервал

Таблица 4. Връзки на лимфомите с други клинични и биологични прояви при хронична HCV инфекция

	Без лимфом (n 124) n (%)	С лимфом (n 12) n (%)	p*	OR	95% CI
Криоглобулини	42 (33.9)	9 (75.0)	0.010	5.8	1.5-22.2
Умора	70 (56.5)	11 (91.7)	0.027	8.4	1.0-67.7
Парестезии	21 (16.9)	6 (50.0)	0.014	4.9	1.4-16.6
Сърбеж	19 (15.3)	7 (58.3)	0.002	7.7	2.2-26.9
Лимфаденомегалия	11 (8.9)	11 (91.7)	0.000	113.0	13.0-959.0
Спленомегалия mm	2 (17.7) 128 ± 20	8 (66.7) 162 ± 30*	0.001	9.2	2.5-33.5
ANA	20 (16.1)	5 (41.7)	0.045	5.7	1.0-12.8

Логистична регресия; *коэффициент на статистическа достоверност при $p < 0.05$, **OR** – отношение на риска, **CI** – доверителен интервал, **n** – брой болни

► Показани са само статистически достоверните резултати

Таблица 5. Лимфоцитни популации при болните с HCV-асоциирани лимфоми

	Лимфом	Брой болни	Средна стойност (109/l)	SD	P*
CD3+ Т лимфоцити	-	33	1.5	0.8	NS
	+	5	0.97	0.05	
CD3+4+ хелперно/индусерни клетки	-	33	0.8	0.5	NS
	+	5	0.6	0.3	
CD3+8+ супресорно/цитотоксични клетки	-	33	0.5	0.4	NS
	+	5	0.3	0.2	
CD3-16+56+ натурални килъри	-	32	0.3	0.4	NS
	+	5	0.1	0.02	
CD57+CD8-	-	27	0.2	0.1	NS
Т и/или NK	+	5	0.09	0.08	
CD57+CD8+	-	24	0.2	0.1	NS
Т и/или NK	+	5	0.1	0.09	
CD19+B Ly в лимфоцити	-	33	0.2	0.1	0.000**
	+	5	0.07	0.04	
CD3+HLA-DR+ активирани клетки	-	28	0.2	0.1	NS
	+	5	0.1	0.09	

Student's t-тест, *коэффициент на статистическа достоверност при $p < 0.05$, **SD** – стандартно отклонение

Особеностите в клиничното протичане при болните с HCV-асоциирани лимфоми са представени на табл. 4.

Флуцитометричният анализ на лимфоцитни популации от периферна венозна кръв показва намален брой В-лимфоцити при болните с HCV-асоциирани лимфоми (табл. 5).

ОБСЪЖДАНЕ

Нашите резултати показаха наличие на В-клетъчни неходжкинови лимфоми при 12 от 136 изследвани болни с хронична HCV инфекция (8.8%). При 75% от пациентите с лимфоми установихме криоглобулини, което предполага възможна връзка с наличието на лимфопролиферативни нарушения в хода на инфекцията. Честотата на криоглобулинемията в нашата серия от болни е 37.5%, което е близко до средна-

та наблюдавана честота на криоглобулинемията (44%) при болните с хепатит С в метаанализ на Kayali [13]. В-клетъчни неходжкинови лимфоми установихме при 17.6% от положителните за криоглобулини болни. Тези резултати са близки до данните, публикувани от италианските автори [2, 3, 10], и вероятно са свързани с наличие на специфични етнически, географски и генетични фактори в Югоизточна Европа, към която се отнася и нашата страна. При клиничното проследяване 3 възрастни жени с чернодробна цироза развиха криоглобулинемия и впоследствие лимфом, съответно в период на проследяване от 2, 3 и 5 години. Това потвърждава възможността за преход от бенигнното лимфопрлиферативно нарушение (криоглобулинемия) в малигна лимфопрлиферация (В-клетъчен неходжкинов лимфом). Честотата на лимфомите в нашата серия болни с хронична HCV инфекция без криоглобулини е 3.5%, което не се различава значимо от наблюдаваната честота на лимфомите в общата популация (0-3.1%) [80].

По-висока честота на В-клетъчни неходжкинови лимфоми наблюдавахме при възрастни жени, заразени чрез кръвопреливане при тежко раждане в миналото, което предполага инфектиране с по-висока доза на вируса и по-продължителен период от време за отключване на лимфопрлиферативни увреждания в хода на вирусната инфекция. Наличието на лимфом може да се обсъжда при пациенти с лимфаденомегалия, значително уголемен далак, автоимунни феномени, криоглобулинемия и оплаквания от парестезии, умора и сърбеж, което личи от еднофакторния логистично-регресионен анализ (табл. 4). При флоуцитометричния анализ на лимфоцитни популации от периферна венозна кръв прави впечатление дисбалансът в лимфоцитните субпопулации, като В-лимфоцитите са достоверно намалени (табл. 5).

Наличието на В-клетъчни неходжкинови лимфоми при болните с хронична HCV инфекция е последица от възникването на лимфопрлиферативни нарушения в хода на вирусната инфекция. Криоглобулините са маркер за увреждането на В-лимфоцитите и следва да се търсят при всеки пациент с хронична HCV инфекция, особено при възрастни жени, заразени чрез кръвопреливане при тежко раждане в миналото. Пациентите с криоглобулини следва да се проследят за развитие на В-клетъчен неходжкинов лимфом, особено при наличието на лимфаденомегалия, изразена спленомегалия, намален брой на В-

лимфоцитите от флоуцитометричния анализ и съпътстващи автоимунни феномени.

Библиография

1. Clifford, B. D. et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. – *Hepatology*, **21**, 1995, 613-619.
2. Damasco, F. et al. The lymphoid system in hepatitis C virus infection: autoimmunity, mixed cryoglobulinemia and overt B-cell malignancy. – *Semin. Liver Dis.*, **20**, 2000, 143-157.
3. De Vita, S. et al. Characterization of overt B-cell lymphoma in patients with hepatitis C virus infection. – *Blood*, **90**, 1997, 776-782.
4. De Vita, S. et al. Hepatitis C virus, non-Hodgkin's lymphomas and hepatocellular carcinoma. – *Br. J. Cancer*, **77**, 1998, 2032-2035.
5. Dienstag, J. L. et J. G. McHutchinson. American gastroenterological association technical review on the management of hepatitis C. – *Gastroenterology*, **130**, 2006, 231-264.
6. Dietrich, C. F. et al. Enlargement of perihepatic lymph nodes in relation to liver histology and viremia in patients with chronic hepatitis C. – *Hepatology*, **26**, 1997, 467-472.
7. Ferri, C. et al. Mixed cryoglobulinemia: demographic, clinical, and serologic features and survival in 231 patients. – *Semin. Arthritis Rheum.*, **33**, 2004, 355-374.
8. Ferri, C. et al. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. – *Br. J. Rheumatol.*, **36**, 1997, 360-365.
9. Ferri, C. et al. Hepatitis C virus in chronic infection as a common cause of mixed cryoglobulinemia and autoimmune liver disease. – *J. Intern. Med.*, **236**, 1994, 31-36.
10. Ferri, C., S. Pileri et A. L. Zignego. Hepatitis C virus, B-cell disorders, and non-Hodgkin's lymphoma. – In: *Infectious Causes of Cancer. Targets for Intervention*. Goedert J. J., Ed. Totowa, New Jersey, Humana Press, 2000, 349-368.
11. French METAVIR cooperative study group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. – *Hepatology*, **20**, 1994, 15-20.
12. Ghinoi, A. et al. Autoimmune and lymphoproliferative HCV-correlated manifestations: example of mixed cryoglobulinemia. – *G. Ital. Nefrol.*, **21**, 2004, № 3, 225-237.
13. Kayali, Z. et al. Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a meta-analysis. – *Hepatology*, **36**, 2002, 978-985.
14. Lascus, T. et al. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome; specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. – *Hepatology*, **28**, 1998, 1398-1401.
15. McColl, M. D. et al. The role of hepatitis C virus in the aetiology of non-Hodgkin's lymphoma. A regional association? – *Leuk. Lymph.*, **26**, 1997, 127-130.
16. Monteverde, A. et al. Essential mixed cryoglobulinemia, type II: a manifestation of low malignant lymphoma? Clinical-morphological study of 12 cases with special reference to immunohistochemical findings in liver frozen sections. – *Acta Haematol.*, **79**, 1988, 20-25.
17. Monteverde, A., M. Balare et S. Pileri. Hepatic lymphoid aggregates in chronic hepatitis C and mixed cryoglobulinemia. – *Springer Semin. Immunopathol.*, **19**, 1997, 99-110.
18. Morra, E. Cryoglobulinemia. – *Hematology*, **35**, 2005, 368-372.
19. Ohoka, S. et al. Sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is not directly related to hepatitis C virus. – *Hepatology*.