

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanmış Dört Hepatit C Vakası

FOUR HEPATITIS C CASES DETECTED BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Gülen AKYOL*, Ayşe DURSUN**, Michael GERBER***

Yrd.Doç.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD Öğretim Üyesi,

** Doç.Dr.Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD Öğretim Üyesi, ANKAFTA

*** Prof.Dr.Tulane Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Departmanı Şefi, NEW ORLEANS

ÖZET

Hepatit C virüs (HCV) teşhisinde en güvenilir yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) olup, temelde çok düşük türe-deki virüsün saptanabilir düzeye çoğaltılmasına dayanır. HCV'nin karaciğerde kesin tanı koydurtacak spesifik histopatolojisi olmamakla beraber telkin edici bulguları vardır. Dondurulmuş dokuda PZR uygulanması daha kolay olup formalinde tespit edilmiş parafine gömülü dokuda sonuç almak zordur. Oysa bu metodun arşiv materyaline uygulanabilmesi özellikle açıklanamayan hepatit ve hepatosellüler karsinom etyolojisinin araştırmasında çok yararlıdır. Bu çalışmada serolojik olarak B virüs saptanmamış ve histolojik olarak C hepatiti ile uyumlu, daha önce nonA-nonB hepatiti olarak kabul edilmiş 4 materyalde PZR ile HCV varlığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HCV, Polimeraz zincir reaksiyonu, Fikse doku

T Klin Gastroenterohepatoloji 1996, 7:163-165

Hepatit C virüs (HCV) 10 kb'lık bir RNA virüsü olup, serumdaki titresi nadiren 10⁵ şempanze enfektif doza ulaşır ki bu nedenle konvansiyonel metodlarla saptanması güçtür (1). Non-strüktürel polipeptidine karşı oluşturulan C-100-3 antikoru daha önce non-A non-B hepatit olarak kabul edilen vakaların %60'ında serumda saptanmıştır. Bu oran post-transfüzyon non-A non-B hepatitlerinde %80'lere çıkmaktadır (1). Bu çalışmada bölümümüz arşivine ait, histopatolojik özellikleri HCV varlığını düşündüren, serolojik olarak B virüs saptanmamış 4 vakaya ait materyallerde C virüs varlığı araştırılmıştır.

MATERYEL VE METOD

A: Histolojik İnceleme: Dört vakaya ait kesitler gözden geçirildi. Üçü iğne biyopsisi, biri ise insizyonel biyopsi materyaliydi. Rutin hematoksilen-eozin ile boyalı kesitlerin incelenmesi yanısıra safra duktus değişikliklerini değerlendirmede PAS (periyodik asid Schiff) ve fibroblastik aktivite için Gomori retikülün ile Masson trikrom boyaları kullanıldı.

Geliş Tarihi: 30.07.1996

Yazışma Adresi: Dr.Gülen AKYOL
İran Cad. 47/10
GOP, ANKARA

TKlin J Gastroenterohepatol 1996, 7

SUMMARY

Polymerase chain reaction (PCR), which is basically the amplification of the lowest level titer virus to a detectable level, is known to be the most reliable method in diagnosis hepatitis C virus (HCV). HCV lacks specific histopathology enabling us to diagnose it yet, there have been some promising findings. PCR has been more easily applied to frozen tissue while it is difficult to get result from formaline fixed, paraffin embedded tissue. In this study in the materials of 4 cases which were serologically negative for B virus, had the histopathology of C hepatitis and been accepted as nonA-nonB hepatits previously, C virus presence was demonstrated by using PCR method.

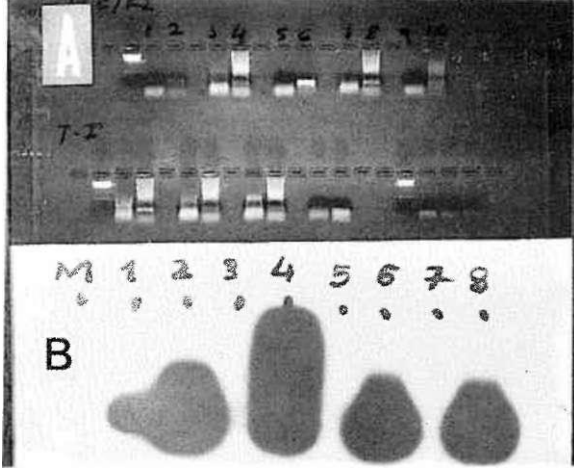
Key Words: HCV, Polymerase chain reaction, Fixed tissue

T Klin J Gastroenterohepatol 1996, 7:163-165

B: Moleküler İnceleme: Daha önce tespitli dokular-da kullanılmak üzere geliştirdiğimiz metod uygulandı (2). 10 mikron kalınlığında 10 adet kesit deparafinize edilerek guanidium ile karıştırıldıktan sonra fenol/kloroform ekstraksiyonunu takiben isopropanolde RNA presipitasyonu yapıldı. Elde edilen RNA tekrar guanidium solüsyonunda eritilip bu kez etanolde çöktürüldü. Nükleik asit miktarları spektrofotometrik olarak 260 nm'de belirlendi. Revers transkripsiyon, amplifikasyon ve hibridizasyon aşamalarında kullanılan primerler Prof.Dr.Carol Shieh (Tulane Üniversitesi Patoloji Bölümü, New Orleans A.B.D.) tarafından Milligan/Blosearch Cyclone (Novato, CA) DNA sentezleyici kullanılarak hazırlandı. Tüm virüsün kodlama yapmayan (non-coding)-NT-bölgesine aitti. Kullanılan primerler ve probun nükleotid dizimleri ve uzunlukları aşağıda verilmiştir.

1 .PZR-sens- 5-CTGTGAGGAACTACTGTC-3'
antisens- 5'-CACTACTCGGCTAGCAGT-3'
2.PZR-sens- 5'-CACGCGAAAGCGTCTAG-3'
antisens- 5'-TTTATCCAAGAAAGGACCC-3' 142bp
probe- 5-AGTATGAGTGCTGTCAGCCTCCAGGA-3'

izole edilen RNA'nın bir kısmı ile dış antisens primer kullanılarak "AMV reverse trancriptase (Promega,



Şekil 1. A) Agaroz jelde ampifiye edilen ürünlerine analizi, ilk sıra lambda DNA imarker'ı olup tüm vakaların 1. ve 2. PZR ürünleri görülmektedir. B) Otoradyografi. ³²P ile işaretli NT bölgesi oligomer proba hibridize edilip, 24 saat -70 C'de bekletildikten sonra.

Madison Wisconsin)" ile cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen DNA ile dış sens primer, taq DNA polimeraz (Promega) kullanılarak 30 sikluluk birinci PZR (PZR-1) başlatıldı. Programda denatürasyon 93 C'de 1 dk, soğuma (annealing) 45 C'de 1 dk ve uzama (ektensiyon) 73 C'de 1 dk şeklindeydi, ikinci PZR için kullanılan primerler ilk çoğaltılan alanın içinden seçilmişti, ilk PZR ürününün 1/10'u kullanılarak ikinci reaksiyon gerçekleştirildi. Çoğaltılmış (amplifiye) DNA segmentleri %2'lik agaroz jelde izlendi (Şekil 1A) ve membrana transfer edildikten sonra hibridizasyon yapıldı. Kullanılan probe iki iç primerin arasındaki sekansa karşılık geliyordu ve terminal deoksिनükleotidyl transferaz kullanılarak ³²P ile işaretlenmişti. Otoradyografi için 24 saat -70 C'de bekletildi (Şekil 1B). Tüm deneylerde pozitif ve negatif oldukları bilinen birer materyal kontrol olarak çalışıldı.

BULGULAR

incelenen 4 vakanın 3'ü daha önce non-A non-B hepatit olarak kabul edilmişlerdi, ancak o dönemde serolojik olarak HCV bakılamamıştı. Bir vakada ise (vaka 4) siroz tanısı verilmiş ve serumda anti-HCV negatif olarak belirlenmişti. Tüm vakalara ait biyopsi materyalleri incelendiğinde C virüse özgü olmayan ancak telkin edici olduğu bildirilen bazı histopatolojik özellikleri gözlemlendi

(3). Bu bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Tüm materyallerde görülen ortak özellik portal lenfoid agregatlarıdır (Şekil 2). Steatozis genellikle makroveziküler tipte olup yaygınlığı her materyalde değişiyordu. Sirotik materyalde ise steatozis görülmedi. Safra duktus değişiklikleri çok çarpıcı olmamakla birlikte bir vakada (vaka 1) duktus epitelinde hafif dejeneratif görünüm (eozinofilide artış, sitoplazmada vakuolizasyon gibi) saptandı, iki vakada ise duktüler proliferasyon görüldü. Hiç bir materyalde nekroinfiamatuar aktivite ağır düzeyde değildi.

Yapılan moleküler incelemede 4 materyelde de HCV varlığı saptandı.

TARTIŞMA

Günümüzde HCV'yi tesbitte en hassas yöntem PZR'dur (1,2,4). Birçok çalışmada anti-HCV yokluğunda bu yöntemle hem akut hem kronik dönemde virüsün saptandığı bildirilmektedir (5,6). Biz de bu çalışmada anti-HCV negatif olan bir vakada PZR ile virüs varlığını gösterdik.

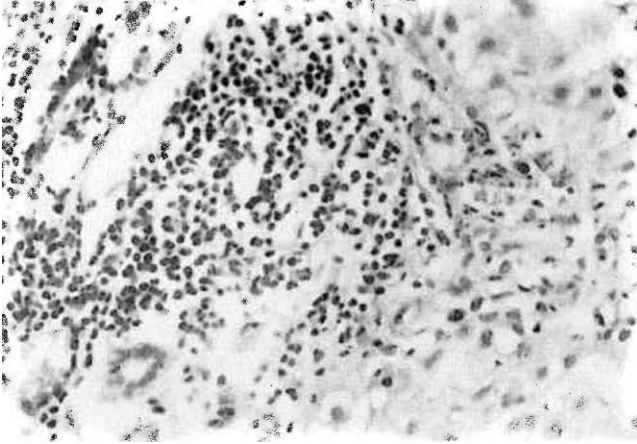
HCV'nin karaciğerde yapabildiği histopatolojik değişiklikler (lenfoid agregat-folikül oluşumu, steatozis, safra duktus değişiklikleri, sinüzoidal inflamasyon) spesifik olmamakla birlikte şüphe uyandırıcıdır. Bunlar arasında en çok önemsenen lenfoid agregat-folikül oluşumdur (3,7). Bizim de çalışmaya aldığımız materyaller bu değişikliklerin bir kısmını gösteriyordu. Özellikle lenfoid agregat oluşumu tüm materyallerde mevcuttu.

HCV, dondurulmuş dokularda PZR ile saptanmıştır (8). Ancak tespit edilmiş dokularda sonuç almak daha güçtür (2,4). Daha önceki çalışmamızda tespitli dokularda HCV'ye ait NS₅ ve kor(core) bölgelerinden hazırlanan primerlerle sonuç alınmadığı için virüsün en iyi korunan NT bölgesine ait primerlerle çalışılmıştır (2). Çift PZR kullanılması ile çok düşük fitrede olabilen virüsün iki kez çoğaltılarak saptanabilme şansı artırılmıştır. Hibridizasyon uygulanarak da çoğaltılan ürünün spesifikliği kontrol edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda sağlıklı kişilerde HCV prevalansının %1 olduğu saptanmıştır. Akut hepatit (C) vakalarının yarısının kronikleştiği, %10'unda ise siroz geliştiği varsayılmaktadır. Uzun yıllar sürebilen bir dönemden sonra %5-10 vaka hepatosellüler karsinomla ortaya çıkabilmektedir (9-11). Tüm bu özellikler gözönüne alındığında HCV'nin saptanabilmesinin önemi ortadadır. Biz de HCV patogenezinin aydınlatılmasında geriye dönüşlü çalışmaların önemli olduğu ve bu bakım-

Tablo 1. Vakalara ait histopatolojik bulgular ve serum anti-HCV sonuçları

Vaka	Serumda anti-HCV	Tanı	Lenfoid agregat	Steatozis	Safra duktus epitel değişiklikleri
1	çalışılmadı	lobular hepatit	+	+	hafif dejeneratif dğk.
2	çalışılmadı	hafif derecede aktif hepatit	+	+	-
3	çalışılmadı	kolestaz ve lobular hepatit	+	+	proliferasyon
4	-	siroz	+	-	proliferasyon



Şekil 2. (HEX400) Portal alanda safra duktusuna komşu lenfoid agregat görülüyor.

dan kullandığımız metodun arşiv çalışmalarına yardımcı olacağı görüşündeyiz.

1. Miyamura T, Saito I, Katayama T. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: Application to diagnosis and blood screening for post-transfusion hepatitis. *Proc Natl Acad Sei USA* 1990; 87:983-9.

2. Akyol G, Dash S, Shieh C, Malter JS, Gerber MA. Detection of hepatitis C virus RNA sequences by PCR in fixed liver tissue. *Mod Pathol* 1992; 5(5):501-4.
3. Scheuer PJ, Ashraf Zade P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepato* 1992; 15:567-71.
4. Diamond DA, Davis GL, Qian KP, Lau JY. Detection of HCV sequences in formalin fixed paraffin embedded liver tissue; effect of interferon therapy. *Med Virol* 1994; 42(3):294-8.
5. Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblott J. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Notl Acad Sci USA* 1990; 87:6441-45.
6. Weiner AJ, Kuo G, Bradly DW. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335:1-3.
7. Gerber MA. Chronic hepatitis C: The beginning of the end of a time honoured nomenclature. *Hepato* 1992; 15:733-4.
8. Shleh CYS, Shim KS, Lampertico P, Balart LA, Jeffers LJ, Thung SN, et al. Detection of hepatitis C virus sequences in liver tissue by the polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1991; 65(4):408-11.
9. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6547-49.
10. Özgür G, Çolakoğlu SA, Seyrek N, Sağlıker Y, Paydaş S, Akkız H. Hemodiyaliz hastalarında anti-HCV sıklığı. *Turk J Gastroenterol* 1996; 7:17-21.
11. Kiyosawa K, Sodeyame T, Tanaka E. Interrelationship of blood transfusion, non-A non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma-analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepato* 1990; 12:671-5.