

## Seropozitif kronik hepatit C olgularında karaciğer dokusunda HCV antijeni ekspresyonu \*

### The expression of HCV in seropositive chronic hepatitis C cases \*

Neşe Çallı Demirkan <sup>1</sup>, Funda Yılmaz <sup>2</sup>, Gül Yüce <sup>3</sup>, Aşkın Zeytinoğlu <sup>3</sup>, Arzu Sayiner <sup>3</sup>,  
Tijen Özacar <sup>3</sup>, Selda Erensoy <sup>3</sup>, Altınay Bilgiç <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pamukkale Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ

\* Bu çalışma XV. Ulusal Patoloji Sempozyumu 24-27 Mayıs 2000- Antalya'da sunulmak üzere kabul edilmiştir.

Kronik C hepatiti (KCH) olgularında, karaciğer biyopsilerinin bir kısmında karakteristik histopatolojik bulgular izlenebilmektedir. Biopside rutin boyama yöntemleri ile karakteristik C hepatiti bulguları olmayan olgularda tanıya immunohistokimyasal metodla gitme gereği duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı immunohistokimyasal HCV ekspresyonunun özgüllüğünü ve histolojik aktivite ile ilişkisini araştırmaktır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1996-1998 yılları arasında serolojik olarak kanıtlanmış 121 KCH olgusunun parafine gömülü biyopsi materyallerinde monoklonal TORDJI-22 antijeni kullanılarak (Biogenex), HCV antijeninin immunohistokimyasal ekspresyonu araştırıldı. Kronik hepatitin histolojik aktivitesi; portal yangı, safra kanalı zedelenmesi, 'interface hepatit', sinüzoidal yangısal hücre aktivasyonu, fokal nekroz, yağlanma ve demir birikiminin derecelendirilmesi ve fibrozisin skorlanması ile yapıldı.

Sitoplazmik granüler HCV antijeni ekspresyonu 121 olgunun 45'inde (% 37,19) saptandı ve özgüllük ve duyarlılık değerleri sırasıyla %92 ve %54 idi. Dokuda immunohistokimyasal HCV antijeni ekspresyonu ve histolojik aktivite arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olmasa da (p:0,059), immunohistokimyasal olarak HCV antijen pozitifliği olan olgular daha ileri evrede bulundu.

Sonuç olarak bulgularımız karaciğer dokusunda monoklonal TORDJI-22 antikor pozitifliğinin tek başına KCH tanısında yeterli olmadığını ve HCV antijeni ekspresyonunun hepatitin histolojik aktivitesi ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik Hepatit C, immunohistokimya, tanı yöntemleri

In some cases of chronic hepatitis C (CHC), it is possible to observe the characteristic histopathological features in liver biopsy specimens stained with

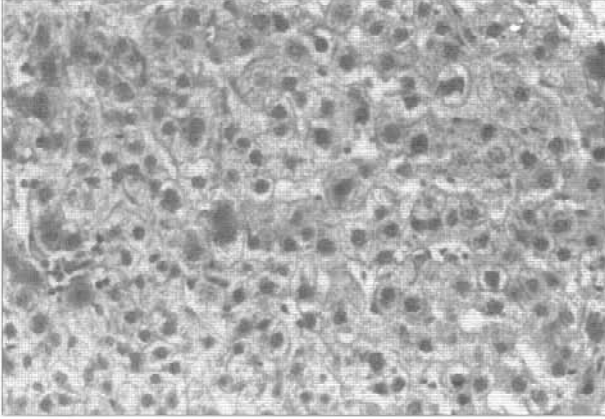
conventional methods. However, characteristic histopathological findings are not always present and there is a need to establish the diagnosis with immunohistochemical methods. This study aims to investigate the specificity of immunohistochemical HCV antigen expression and its correlation with the histological activity of hepatitis.

Immunohistochemical expression of HCV antigen was investigated by using the monoclonal TORDJI-22 antigen (Biogenex), in conventionally processed liver biopsy specimens of 121 cases with serologically proved CHC. Histological activity of chronic hepatitis was assessed by grading of portal inflammation, bile duct injury, interface hepatitis, activation of sinusoidal inflammatory cells, focal necrosis, steatosis and accumulation of iron, and scoring of fibrosis. Cytoplasmic granular HCV antigen expression was detected in 45 out of 121 cases (37.19 %), and specificity and sensitivity values were 92% and 54%, respectively. Although the correlation between the immunohistochemical expression of HCV antigen and histological activity of chronic hepatitis was not statistically significant (p:0.059), cases with immunohistochemical HCV antigen positivity were found to be at a more advanced stage.

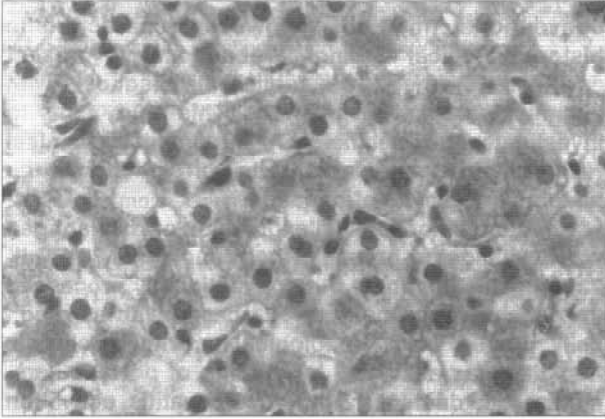
In conclusion our results suggest that positivity of monoclonal TORDJI-22 antibody in liver tissue alone is not sufficient to establish the diagnosis of CHC, and HCV antigen expression is not related with the histological activity of hepatitis.

**Key Words:** Chronic hepatitis C, immunohistochemistry, diagnosis

Hepatit C virusu (HCV), 1989 yılından beri non-A non-B hepatitlerin büyük bir kısmından sorumlu ajan olarak tanınmaktadır <sup>(1,2)</sup>. HCV enfeksiyonunun kesin tanısı serumda spesifik antikorların veya HCV-RNA'nın saptanması ile konur. Biyopside ise lenfoid hücre agregasyonu, safra kanalı hasarı, steatozis ve sinüzoidal yangısal hücre aktivasyonu v.b gibi bulgular C hepati-



**Resim 1:** İntrasitoplazmik HCV antijeni ekspresyonu (fast redX200).



**Resim 2:** Büyük büyütme ile peri nükleer granüler boyanma (fast redX400).

tinin karakteristik bulgularıdır<sup>(3)</sup>. Etkenin dokuda saptanması ancak immünohistokimyasal boyama, in situ hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyonu yöntemleri ile mümkündür. İmmünohistokimyasal yöntemle seropozitif hepatit C hastalarında, farklı laboratuvarlarda, farklı ürünler kullanarak yapılmış çalışmalarda %23-100 arasında değişen pozitiflikler bildirilmiştir<sup>(3)</sup>. Bu yöntemin henüz duyarlılık ve özgüllüğü optimal koşullara ulaşmamış gibi görünmektedir. Oysa tipik histopatolojik bulgulardan yoksun olgularda kesin hepatit C tanısı ancak etkenin dokuda gösterilmesi ile mümkündür. Bu çalışmada kendi laboratuvar koşullarımızda, formaldehitte tespit edilmiş karaciğer dokularında TORDJI-22 antikorunu kullanarak yapılan immün boyamanın duyarlılığını ve özgüllüğünü araştırmayı amaçladık. Ayrıca dokuda HCV antijeni pozitif ve negatif olan grupları histolojik aktivite ile karşılaştırdık.

### GEREÇ VE YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1996-1998 yılları arasında serumda anti-HCV

ve/veya HCV- RNA pozitif olan kronik hepatitli tedavi almamış 121 olgu çalışmaya alındı. Kesin tanı kriteri (gold standart) olarak serumda HCV-RNA pozitifliği kabul edildi. Bu olgularda ve ek kontrol grubu olan 13 olguluk anti-HCV ve HCV-RNA (-) kronik hepatit B olgularında karaciğer dokusunda HCV antijeni ekspresyonu araştırıldı. Serum anti-HCV varlığı ELİSA (UBI HCV EIA 4.0 United Biomedical Inc, USA) ile, HCV-RNA varlığı ise RT-PCR (COBAS AMPLICOR, Roche Diagnostics USA) yöntemi ile test edildi. PCR çalışma kurallarına kesinlikle uyuldu. Her örneğin internal kontrolü değerlendirildi. Karaciğer biopsileri % 10'luk tamponlu formaldehit ile tespit edilip, parafine gömüldükten sonra Hematoksileneozin, Masson-Trikrom, Prusya mavisi, ve retikülün boyaları ile boyandı. İmmün boyama için monoklonal sıçan IgG (HCV88) antikorunu kullanıldı (TORDJI-22).

İmmünohistokimyasal inceleme için dört mikron kalınlığındaki kesitler parafinden uzaklaştırılıp rehidrate edildikten sonra %3'lük hidrojen peroksitte 15 dakika tutuldu. Proteazla ön işleminden geçirilen kesitler Tris tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra TORDJI-22 antikorunda (Biogenex), bir saat oda ısısında tutuldu. Daha sonra Alkalen fosfataza bağlı sekonder antikorda (Dako AP-AAP kit, Danimarka) 20 dakika tutulduktan sonra Tris tampon solüsyonda yıkanarak 10 dakika label compound damlatılarak yöntem sürdürüldü. Kromojen olarak fast red ve zemin boyası olarak Mayer' in hematoksileni kullanıldı.

Krawczynski ve ark.larının tarif ettiği gibi ince sitoplazmik granüler boyanma gösteren en az beş hepatosit varlığında boyanma pozitif kabul edildi (Bisceglie). Histokimyasal boyalarda saptanan lipofusin veya safra pigmenti varlığında, çapraz reaksiyon göz önüne alınarak immün boyanmalar yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi.

Karaciğer biyopsilerinde; portal yangı, safra kanalı zedelenmesi, 'interface hepatit', sinüzoidal yangısal hücre aktivasyonu, fokal nekroz, yağlanma, demir birikimi ve fibrozis gibi histolojik bulgular semikantitatif olarak değerlendirildi.

Dokuda HCV antijeni pozitifliği ile histolojik aktivite, yaş ve cinsiyet arasındaki ilişki t testi ve Ki-kare testleri ile, duyarlılık ve özgüllük değerleri ise standart tekniklerle değerlendirildi. Gerçek pozitif değerler serum HCV-

+ Serumda HCV-RNA	İmmün boyama ile HCVAg	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	45	38
Negatif	1	12

Duyarlılık:  $(45/45+38) \times 100 = 0,54$  %54

Özgüllük:  $(12/1+12) \times 100 = 0,92$  %92

Teşhis değeri:  $96-(38+1)/96 = 0,59$  %59

RNA'sı pozitif grupta doku HCVAg'i de pozitif olan olgular, yalnızca pozitif değerler ise HCV-RNA'sı negatif olgularda doku HCVAg'i pozitif olan olgulardır.

## BULGULAR

Yaşları bilinen 108 olgunun yaşları 6 ile 72 arasında değişiyordu ve yaş ortalaması 41,12 (SD:14,58) idi. Olguların 74' ü erkek, 47' si kadın hasta idi. (1,5E/1K). Olgulardan 83' ünde hem anti-HCV hem de HCV-RNA sonuçları, 38' inde ise sadece anti-HCV değeri biliniyordu. Dokuda HCV antijeni, 121 olgunun 45 tanesinde pozitif bulundu (% 37,19). HCV enfeksiyonunu saptamak için; serum HCV-RNA'sını altın standart (gold standart) olarak, 13 olgulu kontrol grubu ile birlikte toplam 96 olguda immunhistokimyasal yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığını hesapladığımızda sırasıyla %92 ve %54 değerleri bulduk (Tablo I).

HCV antijeni pozitif olan grupta yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımı istatistiksel olarak anlamlı değildi. Histolojik aktivitesi değerlendirilebilen 110 olgunun derece ve evre ortalaması incelendiğinde HCV antijeni pozitif olgularda sırasıyla 7,76 ve 2,41; HCV antijeni negatif olgularda sırasıyla 6,64 ve 1,9 bulundu. Histolojik evrenin dokuda HCV antijeni ile ilişkisi araştırıldığında istatistiksel bir anlamlılık saptanmasına rağmen (p: 0,059), HCV pozitif grupta evrenin daha yüksek olduğu dikkati çekti (HCV pozitif grubun ortalama evresi: 2,41; HCV negatif grubun ortalama evresi: 1,91 ). Histolojik aktivite ile dokuda HCV antijeni arasında bir ilişki yoktu (p:0,301).

Olgulardan 5 tanesinin iki yıllık süre içinde tedavi sonrası kontrol biyopsileri mevcuttu. Bunlardan 2'si tedavi sonrası negatifleşirken, 2 tanesi sonradan pozitifleşen HCVAg boyanması göstermekte idi. Bir tanesi ise tedavi başında ve sonunda hep negatifti. Olgu sayısı yetersiz olduğu için doku HCVAg pozitifliği ile tedavi arasındaki ilişki istatistiksel olarak test edilemedi.

## TARTIŞMA

Hepatit viruslarının, özellikle hepatit B virusunun immunhistokimyasal olarak dokuda saptanması bir çok laboratuvar da morfolojik ve serolojik tanıyı destekleyici bir metod olarak kullanılmaktadır. Ancak C hepatiti ile ilgili immun boyama sonuçları henüz optimal koşullara ulaşmamış gibi görünmektedir. İlk kez 1990 yılında dokuda florosein izotiyosiyana (FITC) bağlı HCV'unun gösterilmesinden sonra, virusun zarf E1, E2 , core, yapısal ve yapısal olmayan proteinleri (NS1-5 vb. gibi) farklı immunreaktif epitoplara bulunmuştur<sup>(4)</sup>. Taze veya parafine gömülü doku kesitlerinde poliklonal veya monoklonal antikorlarla yapılmış çeşitli çalışmalarda %23-%100 arasında değişen pozitiflikler saptanmıştır<sup>(1,2,5,6,7,8,9,10,11)</sup>. Monoklonal TORDJI-22 antikorunu kullanarak yapılmış bu çalışmada seropozitif 121 olgunun %37,19' unda dokuda HCVAg pozitif bulunmuştur. Serum HCV-RNA düzeyini altın standart olarak immun boyama yönteminin duyarlılık ve özgüllük değerleri araştırıldığında

sırasıyla %54 ve %92 oranları bulunmuştur. Literatürdeki diğer çalışmalarda dokuda HCV antijeni duyarlılığının düşük bulunması daha çok immun boyama prosedüründen kaynaklanan nedenlere bağlanmaktadır<sup>(2,13,14)</sup>. Tespit solüsyonu immun boyanmayı en çok etkileyen faktörlerden biri olarak tanımlanmaktadır. En iyi boyanma tespit-siz, taze dokularda elde edilirken, tespitli dokularda %1 formalinin diğer kloroform, aseton ve CCl<sub>4</sub> tespit solüsyonlarına göre en iyi sonucu verdiğini bildiren çalışmalar vardır<sup>(10,15)</sup>. Buna karşılık formaldehit ve parafinin viral antijenleri maskeleyiği veya hasara uğrattığı yönünde de görüşler vardır<sup>(3,5)</sup>. Biz rutin laboratuvar koşullarımızda kullandığımız % 10 formaldehit tespiti ve proteaz ön işleminden sonra optimal boyanmayı elde ettik. Aynı antikor kullanılarak yapılmış literatürdeki başka iki çalışmada da proteaz ön işlemi seçilmiştir<sup>(13,16)</sup>. Blight ve arkadaşları ise formaldehit tespitli dokuda FITC'ye bağlı poliklonal NS4 antikorunu ile immun boyama yapmış ve tripsin enzimi ile ön işleminden geçirmiş, ancak bunun boyanmayı artırmadığını saptamıştır<sup>(1)</sup>.

Parafin blokta HCV' unu saptama yöntemleri arasında olan in-situ hibridizasyon ve RT-PCR metodları uygulaması pratik ve ucuz olmadığı için rutin çalışmalarda çok tercih edilmemektedir. Bu yöntemlerin de yalnızca negatiflik oranlarının yüksek olduğu bildirilmektedir<sup>(8)</sup>.

Dokuda HCV antijeni varlığı sadece tanıyı desteklemek amacıyla değil, aynı zamanda virus-konak arasındaki ilişkiyi veya tedaviye yanıtı araştırmak için de kullanılmaktadır<sup>(9,7)</sup>. Biz de hepatit aktivitesi ile dokudaki pozitifliği karşılaştırarak hepatoselüler hasarda virusun direkt rolünün olup olmadığını araştırdık. İstatistiksel olarak aktivite derecesi ile dokudaki HCV pozitifliği arasındaki ilişki anlamlı değildi. Ancak dokuda HCV pozitif olguların daha ileri evrede oldukları dikkati çekti (p:0,059). Rodriguez-Inigo ve arkadaşları in situ hibridizasyon yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada viremi düzeyi ile infekte hepatosit sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptarken, histolojik aktivite indeksi ile HCV pozitif hepatosit sayısı arasında bir korelasyon saptamamışlardır. Buna bağlı olarak karaciğer hasarının direkt viremi seviyesi ile ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır<sup>(17)</sup>. Biz de HCV pozitif hücre oranına bakmaksızın en az beş hücre boyanmasını pozitif kabul ederek yaptığımız bu çalışmada hepatitin , aktivite derecesi ile doku HCV antijeni ekspresyonu arasında bir ilişki saptamadık, buna karşılık HCV ekspresyonunun hepatitin ileri evrelerinde artabileceği yönünde sonuç elde ettik. Fibrozisle orantılı olan bu pozitifliği biz de Gonzales ve arkadaşları gibi teorik olarak hücrede biriken virusun direkt sitopatik etkisi olarak yorumladık<sup>(2,14)</sup>.

Tedavinin dokuda HCVAg boyanması üzerine etkisini araştırmak amacıyla tedavi sonrası kontrol biyopsileri olan beş olguda ikinci biopsileri ayrıca değerlendirdik. Ancak heterojen sonuçlar elde ettik. Di Bisceglie ve arkadaşları taze dokuda FITC'ye bağlı antikorla yaptıkları çalışmada, tedavi sonrası boyanmanın azaldığını bildirmişler ve antiviral tedaviye yanıtın immün boyama ile takip edilebileceğini savunmuşlardır<sup>(7)</sup>. Ancak bu konuda önümüzdeki yıllarda yapılacak daha kapsamlı

araştırmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak dokuda TORJ-22 antikorunun düşük duyarlılık göstermesi nedeniyle tarama testi olarak kullanılamayacağına, ancak immünohistokimyasal incelemenin hepatit C patogenezi araştırma yöntemlerinden biri olması nedeniyle daha yüksek spesifik reaktivite gösteren HCV antikorların üretilmesi gerektiğine inanıyoruz.

#### KAYNAKLAR

1. Blight-K, Rowland-R, Hall-PD, Lesniewski-RR, Trowbridge-R, LaBrooy-JT, Gowans-EJ Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1568-73
2. Gonzalez-Peralta RP, Fang JW, Davis GL, Gish R, Tsukiyama-Kohara-K, Kohara-M, Mondelli-MU, Lesniewski-R, Phillips-MI, Mizokami-M Optimization for the detection of hepatitis C virus antigens in the liver (published erratum appears in ) *J Hepatol* 1994; 20:143-7
3. Scheuer PJ, Krawczynski K, Dhillon AP Histopathology and detection of hepatitis C virus in liver. *Springer Semin Immunopathol* 1997;19:27-45
4. Rehermann B Immunopathogenesis of viral hepatitis. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1996; 10: 483-500
5. Sansonno D, Dammaco F. Hepatitis C virus c100 antigen in liver tissue from patients with acute and chronic infection. *Hepathology* 1993; 18:240-5
6. Ballardini G, Groff P, Pontisso P, Glostra F, Francesconi R, Lenzi M et al. Hepatitis C virus (HCV) genotype, tissue HCV antigens, hepatocellular expression of HLA-A,B,C, and intercellular adhesion-1 molecules. *J Clin Invest* 1995;95:2067-75
7. Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Krawczynski K. Changes in hepatitis C virus antigen in liver with antiviral therapy. *Gastroenterology* 1993;105:858-62
8. Yap S-H, Willems M, Oord JV, Habets W, Middeldorp JM, Hellings JA, Nevens F, et al Detection of hepatitis C virus antigen by immuno-histochemical staining: a histological marker of hepatitis C virus infection. *J Hepatology* 1994; 20: 275-81
9. Ballardini-G, Groff-P, Giostra-F, Francesconi-R, Miniero-R, Ghetti-S, Zauli-D, Bianchi-FB Hepatocellular codistribution of c100, c33, c22, and NS5 hepatitis C virus antigens detected by using immunopurified polyclonal spontaneous human antibodies. *Hepatology* 1995; 21:730-4
10. Blight-K, Lesniewski-RR, LaBrooy-JT, Gowans-EJ Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology.* 1994; 20: 553-7
11. Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y et al. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology* 1992; 16: 306.
12. Demirhan B, Boyacıoğlu S, Turan M, Hizel N. Hemodiyaliz hastalarında serumda PCR yöntemi ile HCV-RNA, immünohistokimya yöntemi ile de karaciğer dokusunda HCV antijen varlığını göstermenin değeri. XIII. Ulusal Patoloji Kongresi, 4-8 Eylül 1997 İstanbul
13. Brody-RI, Eng-S, Melamed-J, Mizrachi-H, Schneider-RJ, Tobias-H, Teperman-LW, Theise-ND Immunohistochemical detection of hepatitis C antigen by monoclonal antibody TORJ-22 compared with PCR viral detection. *Am J Clin-Pathol.* 1998; 110: 32-7
14. Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, Lau JYN Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatology* 1994;21:255-9
15. Nouri-Aria KT, Sallie R, Mizokami M, Portmann BC, Williams R Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. *J-Pathol* 1995; 175: 77-83
16. Komminoth P, Adams V, Long AA, Roth J, Saremaslani P, Flury R, Schmid M, Heitz PU Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in-situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in-situ RT-PCR. *Pathol Res Pract* 1994; 190: 1017-25
17. Rodriguez-Inigo-E, Bartolome-J, de-Lucas-S, Manzarbeitia-F, Pardo-M, Arocena-; Gosalvez-J, Olliva-H, Carrero-V Histological damage in chronic hepatitis C is not related to the extent of infection in the liver. *Am J Pathol* 1999;154:1877-81