

Kronik B hepatit enfeksiyonunda immünohistokimyasal yöntemle HBsAg boyanma paternlerinin tanısal önemi: Immünohistokimyasal, serolojik ve histolojik bulguların karşılaştırılması

The diagnostic value of immunohistochemically HBsAg staining patterns in chronic hepatitis B infection: correlation among histological, serological and immunohistochemical findings

Dr. Selçuk BİLGİ, Dr. İsmail ÇIRPAN, Dr. Kemal KUTLU, Dr. Sedat ÖZDEMİR, Dr. Gülbin DÖKMECİ

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim ve Gastroenteroloji Bilim Dalı, Edirne

ÖZET: Kronik B hepatitinin prognozu ve tedavisinin tabiki açısından ve yanısıra bu olgularda hepatosellüler karinoma riskinin yüksek oluşu sebebi ile virolojik devrelerin belirlenmesine büyük önem verilmelidir. Bu amaçla kronik hepatit B enfeksiyonu tanısı alan 16 olgu histolojik, serolojik ve immünohistokimyasal tekniklerle HBsAg ekspresyonu açısından değerlendirildi. Enfeksiyonun doğal gidişi sürecinde izlediği replikasyon, eliminasyon ve integrasyon devreleri histolojik ve immünohistokimyasal olarak karşılaştırıldı. İlk devrede histolojide hafif nekroenflamasyon karaciğer dokusunda az sayıda hepatositte HBsAg ekspresyonu gözleendi. İkinci devrede, histolojik lezyonlar şiddetli ve küçük gruplar halinde hepatositlerde HBsAg ekspresyonu vardı. Son devre olan, integrasyon devresinde histolojik bulgular minimal ya da hafif, immünohistokimyasal tekniklerle HBsAg ekspresyonu yoğun olarak çok sayıda hepatositte gözleendi. Sonuç olarak, tam bir kronik hepatit değerlendirmesi için histolojik ve serolojik bulgularla beraber immünohistokimyasal bulguların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: kronik hepatit B, viral fazlar, histoloji, seroloji, immünohistokimya

KARACİĞER biopsisinin kronik hepatitlerde tanıyı doğrulama, diğer lezyonlardan ayırıcı tanıyı sağlama, nekroenflamasyonun derecelendirilmesi, fibrotik evrenin saptanması ve tedavi etkilerinin değerlendirilmesinde tartışılmaz bir değeri vardır. Kronik viral hepatit B hakkında bilinen immunopatolojik veriler ışığında HBV'nin hepatositlere doğrudan sitopatik olmadığı, karaciğer hücre hasarının konağın immun yanıtı ile oluştuğu bilinmektedir (1). Karaciğerde nekroenflamasyon replikatif fazdan nonreplikatif faza dönüşüm süresince oluşur. Nekroenflamasyon, replikasyon

SUMMARY: Determining the viral phases highlights the prognosis and management of therapy of chronic hepatitis B infections. The natural course of infection proceeds through replication, elimination and integration phases. The histological findings and immunohistochemical results of these phases were compared with each other. In the first phase, liver biopsy revealed mild necroinflammation, HBsAg was found in the scattered hepatocytes. In the second phase, histologic lesions were severe and HBsAg was found in the focally grouped hepatocytes in liver tissue. In the third phase, histologic findings were mild or minimal but HBsAg was expressed in numerous hepatocytes massively. In conclusion, for an effective evaluation one must take the histological, and serological findings into account together with the immunohistochemical findings.

Key words: chronic hepatitis B, viral phases, histology, serology, immunohistochemistry

na neden olan hepatositlerin eliminasyonu sürecinde gelişir (2,3).

Kronik hepatit B olguları değerlendirilirken karaciğer hücre hasarının derecesi çok önemlidir. Kronik hepatitlerin derecelendirilmesinde birçok sistem tanımlanmıştır (4-6) ancak en yaygın kullanılan Knodell skoru (5) olarak da bilinen Histolojik Aktivite indeksidir (HAI) (7) (Tablo 1).

Bu nekroenflamasyonun değerlendirilmesinde virolojik fazların durumu belirgin önem taşır. Kronik B hepatitlerinde, replikasyonun aşamasını gösterebilmek için immünohistokimyasal tekniklerle HBV antijenlerinin gösterilmesi yararlı olabilir (2).

Kronik viral hepatit B'nin doğal gidişi 3 aşamada izlenir (1,8,9). Birinci devre viral replikasyon aşamasıdır; bu fazda hastada semptomlar az olur ya

Tablo 1. HAI Elemanları (5)

Elemanlar	Skor
1. Periportal nekroz, köprüleşen nekroz olsun ya da olmasın	0-10
2. intralobular dejenerasyon ve fokal nekroz	0-4
3. Portal enflamasyon	0-4
4. Fibrosis	0-4

da hiç olmaz. HBsAg hepatositlerde seyrek, tek tek sitoplazmik ya da fokal odaklar halinde hepatositlerde membranöz paternde görülür (10). Bu fazda histolojide nekroinflamasyon minimal ya da hafif aktiviteli olarak gözlenir. İkinci devre virüs eliminasyon aşamasıdır; bu aşamada transaminazlar yükselir ve biopside nekroenflamasyon belirginleşip, geniş litik lezyonlar saptanabilir. HBsAg fokal gruplar halinde hepatositlerde sitoplazmik ve tek tek birçok hepatositte membranöz paternde görülür (10). Üçüncü faz viral integrasyon fazıdır; bu fazda transaminazlar düşer ve biopside iltihabi aktivite minimal yada hiç yoktur ancak tekrarlayan ataklar veya yaygın litik lezyonlar oluşmuş ise siroz görülebilir. Bu safhada hepatositlerde HBsAg sekresyonu yetersizdir ve çok sayıda hepatositde yoğun olarak "ground glass" görünümünde birikir (1). Bu üçüncü aşama klasik "sağlıklı" HBsAg taşıyıcı durumunu ifade eder ve bunlarda hepatosellüler karsinoma riski yüksektir (10,11).

Biz bu çalışmamızda , kronik viral hepatit B olgularımızda histolojik aktivite indeksi ile immünohistokimyasal teknikle karaciğer dokusunda HBsAg saptanan hepatosit yoğunluğu, boyanma paterni ve viral fazların arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1989-1994 yılları arasında kronik he-

patit ve/veya siroz tanısı almış 38 olguya ,serolojik sonuçlara bakılmaksızın monoklonal anti-HBsAg (DAKO-A/S Copenhagen-Denmark, anti-Hepatitis B surface antigen) Peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) immünohistokimyasal yöntemle uygulandı. Chromogen olarak AEC kullanıldı. Anti-HBsAg pozitif boyanan 16 olgu çalışmaya alındı. Anti-HBsAg negatif bulunan 22 olgu ,klinik olarak HBV enfeksiyonunu düşündürse de çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya alınan 16 olgu hem klinik hem de serolojik olarak HBV enfeksiyonu ile uyumlu idi. Bu olgulara Gomori Retikülin ve Masson Trichrome boyama uygulandı. Bu 16 olgu tekrar gözden geçirilerek Knodell Skor sistemine (5) göre histolojik aktivite indeksleri (Tablo 1) saptandı ve Desmet ve arkadaşlarının önerdiği (7) kronik hepatit sınıflaması (Tablo 2) temel alınarak sınıflandırıldı. Hastahanemizde HBV-DNA bakılmadığından dolayı olgularımızda HBeAg viral replikasyon belirleyicisi olarak göz önüne alındı. Olgularımızdaki HAI ile immünohistokimyasal teknikle HBsAg boyanma paterni ve HBsAg içeren hepatosit sayısının yoğunluğu ışık mikroskopunda incelendi.

Boyanma paterni membranöz ve/veya sitoplazmik olarak sınıflandırıldı. HBsAg içeren hepatosit sayısının yoğunluğu tek tek, seyrek (%1-10 hepatosit) ise 1; küçük gruplar halinde (%11-20) ise 2; difüz gruplar halinde (%20'den fazla) ise 3 olarak değerlendirildi. Ancak bazı olgularda difüz gruplar halinde ve tek tek hepatosit boyanması beraber izlendiğinden Tablo 3'de her iki kategori beraber verildi.

BULGULAR

Tüm bulgular Tablo 3'de gösterilmektedir. Kronik hepatit tanısı alan 16 olgumuzun yaş ortalamaları 47,6 idi. Kadın/erkek oranı belirgin şekilde (%81) erkek üstünlüğü gösterdi. Histopatolojik olarak 3 olgumuz minimal kronik hepatit (KH), 7 olgumuz hafif KH, 3 olgumuz orta KH ve 3 olgu-

Tablo 2. Derecelendirme ve sınıflandırmaların karşılaştırılması (7)

HAI ^a	Yeni Tanımlar	Olası eski tanımlar
1-3	Minimal kronik hepatit	nonspesifik reaktif hepatit KLH KPH
4-8	Hafif kronik hepatit	Ağır KLH,KPH Hafif KAH
9-12	Orta kronik hepatit	orta KAH
13-18	Ağır kronik hepatit	ağırKAH bridging nekrozlu

^a yalnız 1.,2. ve 3. elemanlar (Tablo 1'deki)
KLH, kronik lobular hepatit; KPH,kronik persistan hepatit
KAH, kronik aktif hepatit

Tablo 3. Bulgular

No	C	Y	HAI	HBsAg Paterni Dokuda	HBsAg (+) Hepatosit sayısı	Viral Markerler Serumda		
						HBsAg	HBeAg	Anti-HBeAg
1	K	61	Min. KH	tek tek sitoplazmik ve membranöz	1	+	+	-
2	E	72	Min. KH	tek tek ve küçük gruplar halinde sitoplazmik	2	+	+	-
3	E	51	Hafif KH	gruplar halinde, yoğun, sitoplazmik	3	+	+	+
4	E	64	Orta KH	tek tek sitoplazmik	1	+	+	+
5	E	68	Orta KH	tek tek sitoplazmik	1	+	+	+
6	E	71	Orta KH	gruplar halinde, sitoplazmik	2	+	+	+
7	E	32	Ağır KH	tek tek ve gruplar halinde membranöz ve sitoplazmik	1	+	+	+
8	E	31	Ağır KH	tek tek ve gruplar halinde membranöz	2	+	+	+
9	E	50	Ağır KH	tek tek ve gruplar halinde sitoplazmik	2	+	+	-
10	E	25	Min. KH	gruplar halinde, yoğun, sitoplazmik ve membranöz	3	+	-	+
11	K	55	Hafif KH	tek tek ve gruplar halinde sitoplazmik	3	+	-	+
12	E	61	Hafif KH	tek tek ve gruplar halinde sitoplazmik	3	+	-	+
13	E	39	Hafif KH	yoğun, fokal, tek tek sitoplazmik	3	+	-	+
14	E	43	Hafif KH	tek tek sitoplazmik	1	+	-	+
15	K	44	Hafif KH	gruplar halinde, yoğun, sitoplazmik	3	+	-	+
16	E	40	Hafif KH	diffüz, sitoplazmik	3	+	-	+

KH= kronik hepatit, Min= minimal, C=cins, Y= yaş, No = olgu numarası
1 = %1-10, 2 = %11-20, 3 = %20'den fazla hepatosit

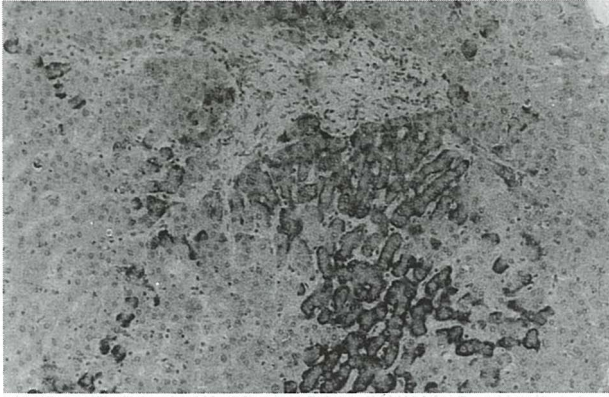
muz ağır KH tanısı aldı.

Viral replikasyon belirleyicilerinden biri olan HBeAg pozitif ve anti-HBeAg negatif bulunan (1.,2. olgu) 2 olgunun histolojik incelemesinde minimal aktiviteli KH saptandı. Bu olgularda fibrose rastlanılmadı. Bu olgularda immünohistokimyasal teknikle HBsAg tek tek hepatositlerde sitoplazmik ve bazı hepatositler de membranöz paternde gözlemlendi (Resim 1).

3-8. olgularımız HBeAg ve anti-HBeAg pozitif idi. Bu olgularda histopatolojik olarak nekroenflemasyon hafiften ağıra kadar dağılım gösterdi. Bu olgularda fibrozis hiç yoktan (Evre 0) siroza (Evre



Resim 1. Olgu 1. Tek tek ve dağınık olarak hepatositlerde immünohistokimyasal HBsAg pozitifliği X 200



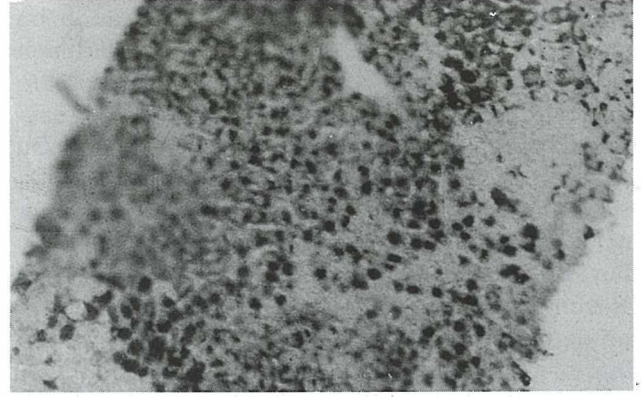
Resim 2. Olgu 7. Fokal alanlarda gruplar halinde ve tek tek hepatositlerde immünohistokimyasal HBsAg pozitifliği X 200.

4) kadar izlendi. Ancak bu grupta iltihabi aktivite , Tablo 3'de de görüldüğü gibi , genellikle şiddetli idi. Viral eliminasyonun ve replikasyonun devam ettiği bu olgumuzda, orta şiddette iltihabi aktivite 4. ve 5. olgularımızda immünohistokimyasal olarak HBsAg tek tek sitoplazmik, ağır aktiviteli olgularda ise tek tek ve küçük gruplar halinde hepatositlerde sitoplazmik boyanma paterni izlendi (Resim 2). 9. olgu HBeAg pozitif, anti-HBeAg negatif olmakla beraber HBsAg boyanma yoğunluğu ve ağır nekroenflamasyon göstermesi üzerine bu grup içinde değerlendirildi. Serolojik sonuçları eliminasyon fazını destekleyen 3 no'lu olgumuz İHK tekniikle HBsAg oldukça yoğun olarak sitoplazmik boyandı.

10-16. olgularımız serolojik olarak viral replikasyonun bittiğini gösteren HBeAg negatif ve anti-HBeAg pozitif olgular idi. Bu olgularda nekroenflamatuar aktivite hafif ve yalnızca 10. olguda minimal olarak değerlendirildi. Bu olguların genelinde fibrozis Evre 1 ile Evre 4 arasında değişmekte idi. HAI'nin düşük olduğu bu olgularda İHK tekniikle HBsAg çok sayıda hepatositte, yoğun, gruplar halinde ve tek tek sitoplazmik ve/veya membranöz paternde izlendi (Resim 3).

TARTIŞMA

İmmunolojideki önemli gelişmeler sonucunda kronik HBV enfeksiyonunun doğal gidişi hakkında son yıllarda büyük ilerlemeler gerçekleşmiştir. Hastalığın doğal gidişinin 3 devreden geçtiği bilinmektedir ve her üç devrenin de kendisine özgü bazı histolojik, serolojik ve immünohistokimyasal özellikleri vardır (12,13). Bu histolojik, serolojik ve immünohistokimyasal veriler ışığında olgularımızı sınıflandırdığımız da 1 ve 2 no'lu olgularımızın replikasyon döneminde, 10-16 no'lu olgularımızın da integrasyon döneminde olduklarını görmekteyiz (Tablo 3). Bu iki grup olgu histolojik



Resim 3. Olgu 15. çok sayıda hepatositte immünohistokimyasal HBsAg pozitifliği X 160.

bulgular açısından değerlendirildiğinde, minimal ya da hafif nekroenflamatuar aktivite göstermektedirler. Bu bulgular daha önceki çalışmalarla uyumludur (1,13). Yalnızca histolojik bulgularla replikasyon ve integrasyon devrelerini ayırt etmek imkansızdır. Serolojik sonuçlarla (HBV-DNA ve HBeAg pozitifliği) histolojik bulgular birlikte değerlendirildiğinde bu ayırım daha etkin görünmektedir. Ancak bizim içinde bulunduğumuz durumda olduğu gibi HBV-DNA'nın bakılmadığı ortamlarda HBeAg ile yorum yapmak bazı sorunlar yaratmaktadır çünkü HBsAg ile beraber serumda HBeAg saptanması her ne kadar replikasyon kanıtı olarak ele alınsa da klinik olarak beklenenin dışında çeşitli serolojik tabloların varlığı bilinmektedir (14). Ancak immünohistokimyasal tekniikle hepatositlerde HBsAg boyanma paterni, histolojik ve serolojik bulgularla beraber ele alınıncaya, bu devreleri ayırt etmek mümkün olmaktadır. Daha önce yayınlanmış olan çalışmalarla uygun olarak integrasyon fazında ki 7 olgumuz da (10-16 no'lu) İHK tekniikle ,özellikle replikasyon fazındaki olgulardan (1 ve 2 no'lu) daha fazla olmak üzere, çok sayıda hepatositte HBsAg sitoplazmik olarak izlenmiştir (Resim 3). Dokuda HBsAg 'nin bu yoğunluğu, histolojik olarak benzer olan replikatif ve nonreplikatif (integrasyon devresi) dönemleri ayırt etmede çok önemli bir katkı sağlamaktadır.

Viral eliminasyon fazı olarak adlandırılan 2. devre kendi içinde histolojik olarak daha şiddetli nekroenflamasyon, serolojik olarak HBeAg'nin anti-HBeAg 'ye serkonversiyonu ve immünohistokimyasal tekniikle de HBsAg' nin gruplar halinde ve/veya tek tek hepatositlerde sitoplazmik boyanma paterni ile ayırt edilebilir (1,13). Bu devrede, replikasyon dönemine oranla daha fazla hepatosit HBsAg pozitifliği gösterir(1). Çalışmamızda ki 7 olgu (3-9 no'lu) bu özellikleri ile bu grupta değer-

lendirildi. İltihabi aktivite en yüksek oranda bu grupta idi ve serolojik sonuçlarımız da beklenen sonuçlardı (Tablo 3). Ancak 4. ve 5. olgularımızın İHK tekniikle HBsAg boyanma özellikleri ilk devredeki olgularla benzeşmekte idi (Tablo 3). Bu gruptaki diğer olgularımız HBsAg boyanma paterni açısından daha önce yayınlanmış çalışmalarla uyumlu olup bu grupta, ilk fazdaki olgulardan daha fazla HBsAg pozitif hepatosit izlendi (Resim 2) (1). Dördüncü ve 5. olgularımızın, ilk faz olguları ile HBsAg boyanma paterni açısından benzeşmesi, olgu sayımızın azlığı ve diğer viral markerların bilinmeyişişinin sonucu olarak düşünüyoruz. Eliminasyon fazı olgularını integrasyon fazından ayırmada histolojik bulguların ve serolojik sonuçların katkısı tartışılmazdır. Özellikle İHK tekniikle HBsAg ekspresyonunun integrasyon fazındaki olgularda en yoğun seviyede saptanmasının (Resim 3) değerlendirmeye büyük ışık tutacağına inanıyoruz. Integrasyon devresindeki bu olgularımız da (10-16 no'lu) histolojide hafif nekroenflamasyon, serolojide anti-HBeAg pozitifliği ve dokuda genellikle büyük gruplar halinde hepatositte HBsAg ekspresyonu literatür ile uyumlu olarak bulundu (1). Eliminasyon devresinin serokonversiyon dönemi olmasından dolayı

serolojik tablolar çeşitlilik kazanır. Bu çeşitlilik eliminasyon devresini değerlendirmede serolojik sonuçların etkinliğini kısıtlayabilir. Eliminasyon devresinde histolojik bulguların şiddetli olması ve İHK tekniikle HBsAg pozitif hepatosit yoğunluğunun olgularımızda ki gibi integrasyon devresindekilerden daha az gözlenmesi söz konusu devreleri ayırt etmede çok önemli destek noktalarıdır.

Etkin bir kronik hepatit değerlendirilmesinde enfeksiyonun doğal gidişi ile ilgili devrelerin belirlenmesi tedavi ve prognoz açısından aşikar bir önem taşır. Özellikle histolojide hafif ya da minimal kronik hepatit bulguları gösteren olgularda serolojik ve İHK tekniikle virolojik devrelerin belirlenebilmesi prognostik açıdan önemlidir. Integrasyon fazındaki olguların da yüksek hepatoselüler karsinoma riski taşıdıkları (1,11) göz önüne alınınca immünohistokimyasal olarak viral anti-jenlerin dokuda boyanma özelliklerinin saptanmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak, karaciğer biopsisinde klasik histolojik bulguların önemi hiç gözardı edilmeden, serolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerinde tanı ve tedaviyi yönlendirmede oldukça önemli olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Desmet VJ: Immunopathology of chronic viral hepatitis. Hepato-gastroenterol 1991; 38:14-21
- Gerber AM, Thung SN: The diagnostic value of immunohistochemical demonstration of hepatitis viral antigens in liver. Human Pathol 1987; 18:771-774
- Huang SN: Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigen in paraffin sections. Lab Invest 1975; 33:88-95
- Ludwig J: The nomenclature of chronic hepatitis: an obituary. Gastroenterology 1993; 105:274-278
- Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, et al: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981; 1:431-435
- Scheuer PJ: Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. J Hepatol 1991; 13:372-374
- Desmet VJ, Gerber AM, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ: Classification of chronic hepatitis, grading and staging. Hepatology 1994; 19:1513-1520
- Stremmel W, Schwarzendrube J, Niederau C, Strohmeyer G: Epidemiology, clinical and treatment of chronic viral hepatitis. Hepato-gastroenterol 1991; 38:22-28
- Moreno A, Martinez CJ, Carreno V: Liver biopsy and etiology diagnosis of chronic hepatitis. J Hepatol 1993; 17 (Suppl. 3):S112-S115
- Hsu HC, Lai MY, Su IJ, Chen DS, Chang MH, et al: Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. Hepatology 1988; 8:405-407
- Shafritz DA, Hadziyannis SJ: Molecular pathobiology of persistent hepatitis B virus infection in relation to chronic liver disease and primary hepatocellular carcinoma. In: Farber E., Phillips MJ, Kaufman N, editors. Pathogenesis of liver diseases. 1987, Baltimore, Williams & Wilkins, 136-152
- Naoumov N, Portmann BC, Tedder RS, Ferns B, Eddleston AL, et al: Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue: Gastroenterology 1990; 99:1248-1253
- Gudat F, Bianchi L, Sonabend W, Thiel W, Aenishaenslin W, et al: Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B: Lab Invest 1975; 32:1-9
- Badur Selim. HBV moleküler viroloji ve serolojik tanı. Kaya Kılıçturgay (editör). Viral Hepatit 94, Viral Hepatit Savaşım Derneği, 65-90