

Kronik Viral Hepatitlerde Knodell Histolojik Aktivite İndeksi ve Proliferating Cell Nuclear Antigen (Ön Çalışma)

Dr. Şükrü O. Özdamar*, Dr. Levent Yıldız*, Dr. Çetin Boran*,
Dr. Mustafa Bakırtaş*, Dr. Bedri Kandemir*,

ÖZET

Hepatositler normalde çok yavaş bir yenilenme hızına sahip stabil hücrelerdir. Kronik viral hepatitin prognozunda karaciğer sirozuna gidiş ve hepatosellüler karsinom gelişimi açısından hepatositlerin regeneratif büyüme hızı kritik bir önem taşır. Bu ön çalışmada, kronik viral hepatitlerde histolojik tablonun sayısal ifadesi olan Knodell indeks profili ile hepatosit proliferasyon hızının belirlenmesinde DNA polimeraz delta'nın yardımcı proteini olan proliferasyon belirleyicisi proliferating cell nuclear antigen (PCNA) indeksinin yeri ve ilişkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. 1994-1995 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından serolojik olarak B ve C hepatit enfeksiyonu tanısıyla izlenen ve Patoloji Anabilim Dalı'nda kronik viral hepatit tanısı konulan 10 adet kronik persistant hepatit ve 10 adet presirotik evreyi de içeren kronik aktif hepatit olgusuna ait toplam 20 karaciğer iğne biyopsi örneğinde, portal inflamasyon, piecemeal nekroz, fibröz portal alan genişlemesi parametreleri derecelendirildi, streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile daha sonra PCNA ekspresyonu araştırıldı. Knodell histolojik aktivite (KHA) indeksi kronik aktif ve persistant hepatitler arasında anlamlı farklılık gösterdi. Kronik persistant hepatitli tüm olgularda KHA indeksi 4 iken, aktif hepatitlerde bu değer tüm olgularda 7 olarak belirlendi ($z=4.98$, $p<0.05$). Kronik aktif ve persistant hepatit gruplarında PCNA indeksleri arasında ve KHA ile PCNA indeks değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($z=0.67$, $p>0.05$ ve $r=0.21$, $p>0.05$).

Anahtar Kelimeler: Kronik viral hepatit histolojik derecelendirme, proliferating cell nuclear antigen.

GİRİŞ

Karaciğerde hastalığın semptomatik, biyokimyasal veya serolojik delillerinin 6 ay veya daha uzun süre devam etmesi ya da tekrarlama kronik hepatit olarak bilinir^(1,2). Kronik hepatit olgularının büyük kısmı viral hepatitlerden özellikle de B ve C virus hepatitlerinden sonra gelişir. B-virus hepatiti geçiren erişkinlerin %15'i ve C-virus hepatiti geçiren hastaların ise %50'sinden fazlası kronik viral hepatit gelişim riski altındadır⁽²⁾. Kronik hepatitler; inflamasyonun yaygınlığı temel alınarak, klinikopatolojik gelişim ve sonuçları birbirinden farklı olan aktif (agresif) ve persistant formlara ayrılmaktadırlar. Persistant hepatitlerde inflamatuvar süreç portal alanlar ile sınırlıyken, aktif formlarda bu, parankim içerisine yayılmakta ve hepatosit harabiyetine neden olmaktadır^(1,2).

SUMMARY

Hepatocytes are stable cells which have very slow proliferative activity. Regenerative activity has a critical role in the progress of chronic viral hepatitis to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In this preliminary study, our aim was to look for the association between Knodell histologic activity (KHA) index which is used for the assesment of histological changes as a quantitative analysis method and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which is the auxillary protein of DNA polymerase-delta, index. Ten patients with chronic persistant hepatitis and ten with cirrhosis + chronic active hepatitis whose serological markers for hepatitis B or C viruses were evaluated in liver biopsy specimens PCNA expressions were studied by streptavidin biotin peroxydase technique. KHA index showed significant difference between chronic persistant and chronic active hepatitis cases. In chronic persistant hepatitis, KHA index was equal or less than 4, and in chronic active hepatitis, the index was equal or more than 7 ($z=4.98$, $p<0.05$). PCNA index was not different in two histologic groups and there was no correlation between KHA index and PCNA expressions ($z=0.67$, $p>0.05$ and $r=0.21$, $p>0.05$).

Key Words: Chronic viral hepatitis, histologic grading, proliferating cell nuclear antigen.

Kronik aktif hepatitler, çok iyi bilinmeyen bazı gelişim mekanizmaları ile karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinom gelişim potansiyeli gösterirler. Karsinogenezde en önemli faktör persistant hepatosellüler nekroz ve bunun sonucu gelişen irrüglü rejenerasyondur⁽³⁾.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin), DNA-polimeraz delta'nın yardımcı proteindir ve proliferasyon hücrede hücre siklusunun geç G1 ve S fazı boyunca sentez edilir, DNA sentezi için gereklidir ve çeşitli lezyonlarda proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılmaktadır^(5,6).

Hepatositler normalde çok yavaş bir yenilenme hızına sahip stabil hücrelerdir. Ancak tümör supresör genlerin inaktivasyonu veya protoonkogenlerin aktivasyonu gibi gen mutasyonları sonucunda proliferasyon için uyarılabilirler. Fibrozisin olmadığı durumlarda proliferatif aktivite sonucu gelişen regenerasyon daha çok iyileşmenin bir göstergesi tabloya fibrozisin katılması siroz gelişimine zemin hazırlayabilir⁽⁴⁾. Kronik viral hepatitlerde hepatositlerin proliferatif aktivitesinin saptanması hastalığın doğal gidişinin önceden belirlenebilmesi ve tedavi

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

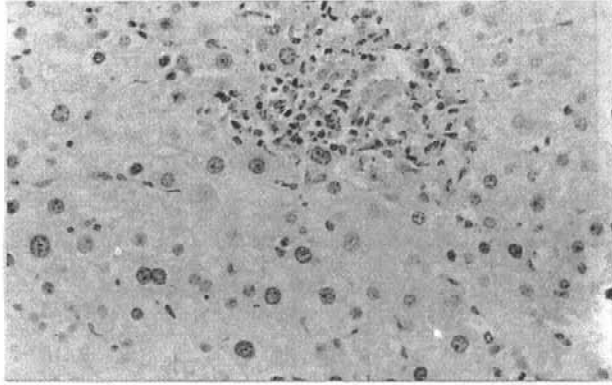
etkinliğinin değerlendirilebilmesine imkan sağlayan bir prognostik faktör olabilir.

Bu çalışmada, kronik viral hepatitlerde hepatosit proliferasyon hızı immünohistokimyasal yöntem kullanılarak PCNA indeksi ile araştırılmış, bunun inflamatuvar aktivite ile ilişkisi incelenmiştir.

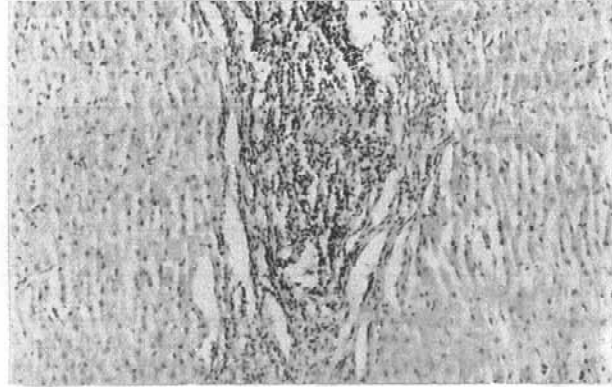
GEREÇ VE YÖNTEM

1994-1995 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda kronik viral hepatit tanısı konulan olguların arasından seçilen 10 adet kronik persistant hepatit ve 10 adet presirotik evreyi de içeren kronik aktif hepatit olgusuna ait toplam 20 karaciğer iğne biyopsi örneği çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan 20 kronik viral hepatitli hastanın 8'inde serolojik olarak Hepatit B virus ve 5'inde de Hepatit C virus enfeksiyonu saptanmıştır.

Yapılan histopatolojik incelemede olgular, konulan histopatolojik tanıdan bağımsız olarak, Knodell ve ark. tarafından önerilen kronik hepatitlerde histolojik tablonun sayısal ifadesi olan modifiye indeks(KHA indeksi; tablo 1) kullanılarak, portal inflamasyon, piecemeal nekroz, fibröz portal genişleme parametreleri derecelendirildi^(1,8). Olgularda retikülün çatısı ve portal alan parankim ilişkisinin değerlendirilmesinde H&E boyasına ek olarak gümüşleme (Gomori) ve trikrom (Gomori) boya yöntemlerinden yararlandı. PCNA immünreaksiyonu için; olgulara ait 20 karaciğer iğne biyopsisi ve kontrol grubu olarak erişkin yaş grubundan seçilen, primer hastalığı karaciğer kökenli olmayan ve histopatolojik olarak normal 8 otopsi olgusuna ait karaciğer doku örneklerininin 24 saat %10'luk tamponlu nötral formalinde fikse edilmiş ve rutin doku takibinden geçirilerek parafine gömülmüş doku örnekleri 5µ kesitlerine, anti-human, mouse PCNA (clone:P10, Zymed., CA, USA) antikoruna streptavidin biotin peroksidaz (Zymed, CA, USA) kiti kullanılarak PCNA ekspresyonu araştırıldı. Değerlendirmede her olgu için boyanmış nükleus/1000 hepatosit nükleusu oranı saptandı. Bulunan değerler ile KHA indeksi değerleri ilişkisi Mann Whitney U ve regresyon analizi testleri kullanılarak değerlendirildi.



Resim 1: Bir kronik Hepatitis B olgusunda PCNA immünreaksiyonu (Olgu 3; KHA indeksi=11) (biotin streptavidin peroksidaz, x400).



Resim 2a: Bir kronik Hepatit C olgusu (Olgu 4; KHA indeksi=10 H&E, x200).

bir fark saptanmadı ($z=0.67, p>0.05$).

Knodell histolojik aktivite indeksi; kronik aktif ve persistant hepatitler arasında anlamlı farklılık gösterdi. Kronik persistant hepatitli tüm olgularda KHA indeksi 4 iken, aktif hepatitlerde bu değer tüm olgularda 7 olarak belirlenmiştir ($z = 4.98, p<0.05$). (tablo 2).

Kronik hepatitlerin KHA indeksi ile PCNA indeks değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($r=0.21, p>0.05$).

TARTIŞMA

Hücre siklusu; sentez öncesi, sentez, mitoz öncesi ve mitoz evrelerinden oluşur ve organizmadaki hücreler yenilenebilme güçlerine ve hücre siklusu ile ilişkilerine göre labil hücreler, stabil hücreler ve permanent hücreler olarak sınıflanırlar. Bu sınıflamada stabil hücreler oldukça düşük bir çoğalma aktivitesi gösterirlerken çeşitli uyarılar karşısında proliferer olurlar⁽²⁾. Stabil grup içerisinde yer alan hepatositler, normalde çok yavaş bir yenilenme hızına sahiptirler. Çeşitli nedenlerle, muhtemelen genotoksik uyarılar sonucu ile de proliferasyona uğrarlar⁽⁴⁾. PCNA ekspresyonu, hem malign potansiyel taşıyan tümörlerde hem de çeşitli lezyonlarda proliferatif/reperatif/rejeneratif aktivitelerin değerlendirilebilmesine imkan sağlamaktadır⁽⁵⁾. Pozitif PCNA immünreaksiyonu; hücre replikasyonu ile ilişkili olarak ekspres edilmesine veya DNA onarımı sonuca oluşan PCNA'nin yeniden dağılımına ve/veya PCNA geninin az veya fazla

SKOR	PORTAL INFLAMASYON	PIECEMEAL NEKROZ	FIBROZIS
0	Yok	Yok	Yok
1	Hafif	<%10	Fibröz portal
2	Hafif-orta	%10-25	İnkompakt septa
3	Orta	%25-50	"Bridging" fibrozis
4	Belirgin	>%50	Siroz

Tablo 1: Modifiye Knodell histolojik aktivite indeksi

BULGULAR

PCNA immünreaktivitesi hepatosit nükleuslarında izlendi. Endojen biotin aktivitesine bağlanan intrasitoplazmik nonspesifik boyanmalar minimal düzeyde saptanmıştır. Reaksiyon gözlenen hepatositler randomize bir dağılım göstermekteydiler. Kontrol örneklerinde ise ancak birkaç tane immünoreaktif hepatosit izlendi (resim1,2). Kronik aktif ve persistant hepatit gruplarında PCNA indeksleri arasında anlamlı

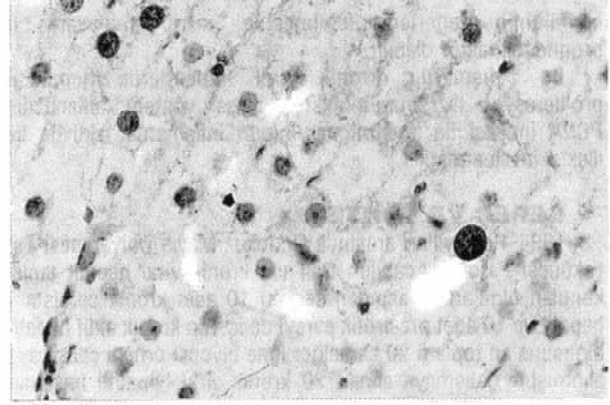
Kronik Viral Hepatitlerde Knodell Histolojik Aktivite İndeksi ve Proliferating Cell Nuclear Antigen (Ön Çalışma)

OLGULAR	SEROLOJİK TIP	PORTAL İNFLAMAS.	PIECEMEAL NEKROZ	FİBROZİS	KHA İNDEKSİ	PCNA İNDEKSİ
1	B	1	0	1	2	0.004
2	B	1	0	2	3	0.196
3	?	2	0	2	4	0.840
4	B	1	0	1	2	0.060
5	?	1	0	1	2	0.026
6	?	2	0	1	3	0.880
7	B	1	0	1	2	0.110
8	C	1	0	0	1	0.050
9	C	1	0	0	1	0.070
10	C	1	0	0	1	0.087

Tablo 2: Kronik persistant hepatitis olgularımızda değerlendirme sonuçları

OLGULAR	SEROLOJİK TIP	PORTAL İNFLAMAS.	PIECEMEAL NEKROZ	FİBROZİS	KHA İNDEKSİ	PCNA İNDEKSİ
1	?	2	3	2	7	0.960
2	B	3	2	2	7	0.016
3	B	4	3	4	11	0.970
4	C	4	3	3	10	0.965
5	?	3	4	4	11	0.310
6	?	4	4	4	12	0.110
7	?	4	4	3	11	0.030
8	B	3	3	3	9	0.020
9	C	3	1	3	7	0.180
10	B	4	4	3	11	0.245

Tablo 3: Kronik aktif (agresif) hepatitis olgularımızda değerlendirme sonuçları



Resim 2b: Aynı olguda inflamasyona komşu hepatositlerde PCNA immünreaksiyonu.

ekprese edilmesi ile ilişkili değişikliklere bağlı olabilir^(5,7). Toshitsugu ve ark., kronik viral hepatitlerde yaptıkları çalışmada, olgu grupları kendi içlerinde önemli farklılıklar gösterebilir de, aktif ve persistant hepatitler arasında proliferatif indeksin anlamlı farklılık gösterdiğini saptamışlardır⁽³⁾. Bu çalışmada persistant hepatitli olguların tümünde PCNA indeksi %3'ün altında kalırken aktif hepatitli olguların %23.4'ünde indeks %3.5'in üzerindedir, ancak Toshitsugu ve ark., PCNA ve KHA indeksleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edememişlerdir⁽³⁾. Kronik viral hepatitlerde olgunun siroza ya da karsinoma ilerlemesinde persistant hepatosellüler nekroz ve bunun sonucunda ortaya çıkan düzensiz rejenerasyon nodülleri önemli rol oynar⁽⁹⁾.

Bu çalışma ile kronik persistant hepatit ve aktif hepatitler arasında histolojik aktivite indeksinin belirgin fark gösterdiği bir kez daha ortaya konmuştur. Özellikle presirotik evreyi içeren olgularda gözlemlendiği üzere siroza gidişte "bridging" fibrozis ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızda aktif hepatit olgularına ait PCNA indeksleri incelendiğinde aralarında önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. PCNA indeksleri arasındaki bu değişkenlik persistant hepatit olgularında bu derecede belirgin değildir. Aktif ve persistant hepatit olgularında PCNA indeksleri arasında da anlamlı fark bulunamamıştır. Bir ön çalışma olan bu araştırmada olgu serisini küçüklüğü ve istatistiksel değerlendirmede non-parametrik test kullanma zorunluluğunun bu sonucu ortaya çıkardığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Desmet V, Gerber M, Hoofnagle J, Manns M, Scheuer P. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1413-1520.
- Cotran R, Kumar V, Robbins S. Pathologic basis of disease. 4th Ed. Philadelphia: Saunders, 1994, 934-936.
- Toshitsugu N, Mayayoshi H, Toshihiko S. Proliferating activity of hepatocytes in chronic viral hepatitis as revealed by immunohistochemistry for PCNA. *Hum Pathol* 1993; 24: 750-753.
- Zajicek G, Oren R, Weinreb M Jr. The streaming liver. *Liver* 1985; 5:293-300.
- Hall PA, Levison RA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
- Geary WA, Cooper PH. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in common epidermal lesions. *J Cutan Pathol* 1992; 19:458-468.
- Woosley JT, Dietrich DR. Prognostic significance of PCNA grade in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1993; 498-503.
- Knodell RG, Ishac KC, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435.
- Ohta G, Nonomura A: Pathology of liver cirrhosis, in Oda T, Hattori N., Mikuriye S, et al (eds): *The Liver-Hepatitis, Hepatocirrhosis, Hepatoma*. Tokyo, Japan, Kanehara, 1990, 171-179.