

Az apoptózis immunhisztokémiai vizsgálata idült májgyulladásokban

Egyed-Zsigmond Imre¹, Egyed-Zsigmond Ilona²

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Patológia Tanszék, ²Szászrégeni Városi Kórház, Fertőző betegségek osztálya

Studiu imunohistochimic al apoptozei in hepatitele cronice

Extinderea metodei examinării histopatologice a biopsiilor hepatice s-a datorat succesului obținut prin tratamentul cu interferoni și medicamente antivirale al hepatitelor C. În ultima perioadă, importanța metodei a fost subliniată și prin recunoașterea caracterului dinamic și bidirecțional al fibrozei, care a ridicat posibilitatea instituirii unui tratament antifibrotic, efectul căruia se poate urmări iarăși prin biopsii hepatice. Numărul relativ mare al biopsiilor hepatice ne-a dat ideea prelucrării comparative imunohistochimice a materialului biptic, prelucrare, care conform posibilităților noastre, cuprinde urmărirea procesului de apoptoză prin evidențierea proteinelor BAX și BCL2, a populației limfo- și histiocitare prin LCA, CD3, CD20, CD68, precum și a leziunilor căilor biliare, prin CTK7 și a transformării celulelor ITO în miofibroblaști, prin Desmina și GFAP. Studiul nostru a cuprins cazurile de hepatită alcoolică, hepatite cronice B și -C, prin examinarea unui număr identic de cazuri. Din acest studiu comparativ prezentăm observațiile legate de apoptoză.

Cuvinte cheie: apoptoză, hepatita cronică, imunohistochimic

Immunohistochemical study of apoptosis in chronic hepatitis

The liver biopsy has long been the gold standard for the evaluation of the state of liver disease in patients with chronic hepatitis C. Nowadays, the importance of this examination was increased by the recognition of the fibrosis as a bidirectional and dynamic process. This raised the possibility of its reversibility and the antifibrotic treatment also requires attentive follow-up of the effects by liver biopsies. The relatively increased number of the biopsies gave the idea of a comparative immunohistochemical examination based on the following: evidence of apoptosis by BAX and BCL2 proteins; a study of the lymphocyte and histiocyte population by LCA, CD3, CD20, CD68; observation of the biliary vascular lesions by CTK7; following the transition of the ITO-cells in myofibroblasts by Desmine and GFAP. We performed our observations in alcoholic, C-, and B-hepatitis in identical number of cases. We present from this comparison our observation regarding only the apoptosis.

Keywords: apoptosis, chronic hepatitis, immunohistochemical

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (1): 38-41

www.orvudert.ro

A májbiopsziák kórszövettani vizsgálatának elterjedését a C-vírus okozta májgyulladás sikeres interferon és antivirális kezelésének pontos nyomonkövetése okozta. Az utóbbi időben fokozta jelentőségét annak felismerése is, hogy az elkötvőszövetesedés kétirányú, dinamikus folyamat, ami felvillantotta megfordíthatóságának lehetőségét és az új, antifibrotikus kezelés, ugyancsak lelkiismeretes hatáskövetést igényel, amit csak májbiopsziák ismételt vizsgálata biztosít [5]. A viszonylag nagy számú anyag adta az ötletet egy összehasonlító immunhisztokémiai vizsgálatra, amelyet lehetőségeinknek megfelelően az apoptózis követésére: BAX és BCL2, a nyiroksejt és histiocyta populáció tanulmányozására: LCA, CD3, CD20, CD68, valamint az epeutak kóros elváltozásainak kimutatására: CTK7, és az ITO-sejt – myofibroblast átalakulás követésére: Desmin, GFAP, alapoztunk. A vizsgálatokat idült C- és B-, valamint alkoholos májgyulladással diagnosztizált esetekben végeztük, azonos számú esetcsoportokban. Ebből az összehasonlításból mutatjuk be az apoptózisra vonatkozó megfigyeléseinket.

Öt év májbiopsziás anyagának átnézése kapcsán (1. táblázat), megfigyeltük, hogy a célzottan C-hepatitis miatt végzett beavatkozásoknak megfelelően az esetek több mint fele C-vírus okozta idült májgyulladás, míg alkoholos májgyulladásos elváltozások, vírusfertőzöttség nélkül, csak ritkán kerültek túbiopsziás vizsgálatra. Kutatási csoportjaink nagyságát, ezért főként az alkoholos biopsziák száma határozta meg, amely 50 esetre korlátozta a különböző etiológiájú májgyulladásos csoportokat. Az 50 alkoholos eset kijelölésében, a vírusmentességen kívül, a biopsziák mérete volt a döntő. Az 50-50 C- és B-vírus okozta májgyulladásos eset kiválasztásában igyekeztünk betartani a nemek közti egyenlő arányt is.

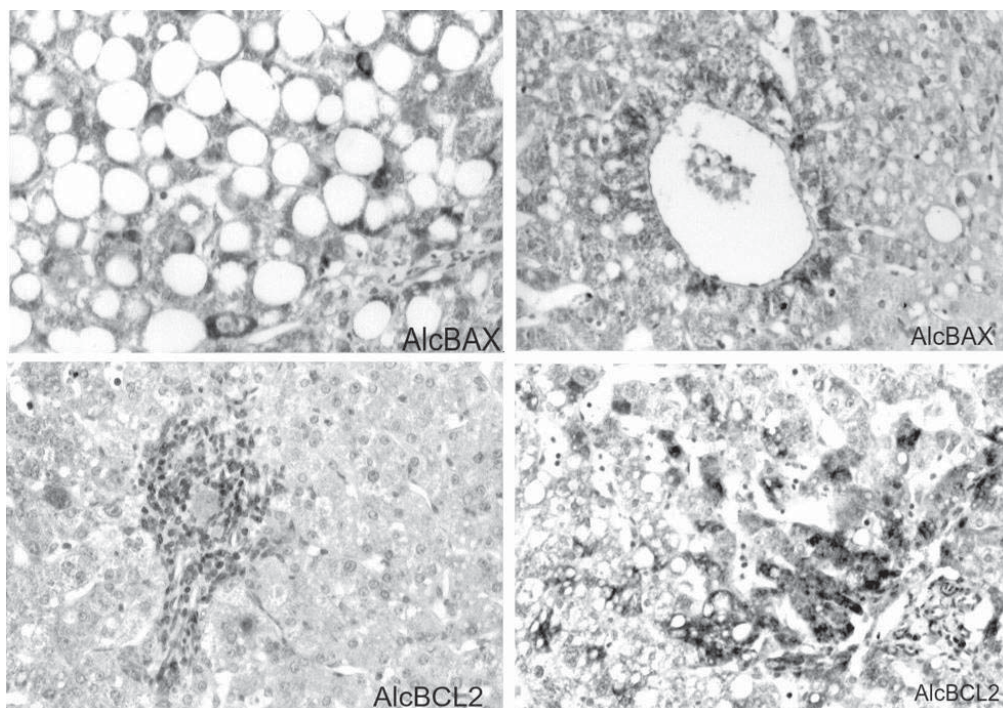
Az apoptózis folyamatát meghatározó két fehérjeféleség kimutatása alapján alkoholos hepatitisben főleg az elzsírosodott májsejtek között találtunk BAX pozitivitást, de ez a lebenyke 3-as zónájának megfelelően is előfordul változó intenzitással. Kifejezett a proapoptotikus fehérje megjelenése az elváltozások körüli, ún. határvonala mentén elhelyezkedő májsejtekben is. Antiapoptotikus védettséget jelentő BCL2 pozitivitás a portális

1. táblázat. Feldolgozott öt év májbiopsziás anyaga

Év	Nr.	U	R	F	N	Életkor csoportok								Májgyulladás		
						0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	Alc	B	C
2003	64	47	17	40	24	-	6	10	17	17	11	3	-	7	25	32
2004	113	84	29	52	61	-	5	9	21	28	41	8	1	12	36	65
2005	88	58	30	49	39	-	2	6	19	31	25	5	-	11	16	61
2006	82	61	21	33	49	1	4	6	12	33	20	6	-	12	15	55
2007	108	66	42	56	52	1	3	8	28	24	32	10	2	14	31	63
total	455	316	139	230	225	2	20	39	97	133	129	32	3	56	123	276
Összesen	455	455		455					455					455		

U=városi, R=falusi, F=férfi, N=nő, Alc=alkoholos-, B=B-vírus okozta-, C=C-vírus okozta





1. ábra. Alkoholos májgyulladás: apoptózis hajlamot jellemző immunhisztokémiai jelenségek

terek nyiroksejtjeit, az epeutak hámszjtjeit, valamint az 1-es zóna hepatocitáit jellemzi (**1. ábra**).

B-vírus okozta idült májgyulladásban BAX pozitív májsejteket mind a lebenyke széli részén, mind pedig pericentrolobulárisan, valamint az elhalás és elkötszövetesedés hídjai mentén ki lehetett mutatni. Megjelent az apoptózis hajlam a portális terek nyiroksejtjeiben, valamint a portális erek endotheliumában is. BCL2 pozitivitást vegyesen találtunk az 1-es és 3-as zóna májsejtjeiben, valamint a sinusoid körüli orsósejtjeiben (myoepitheliális sejtek, Kupffer-sejtek) (**2. ábra**).

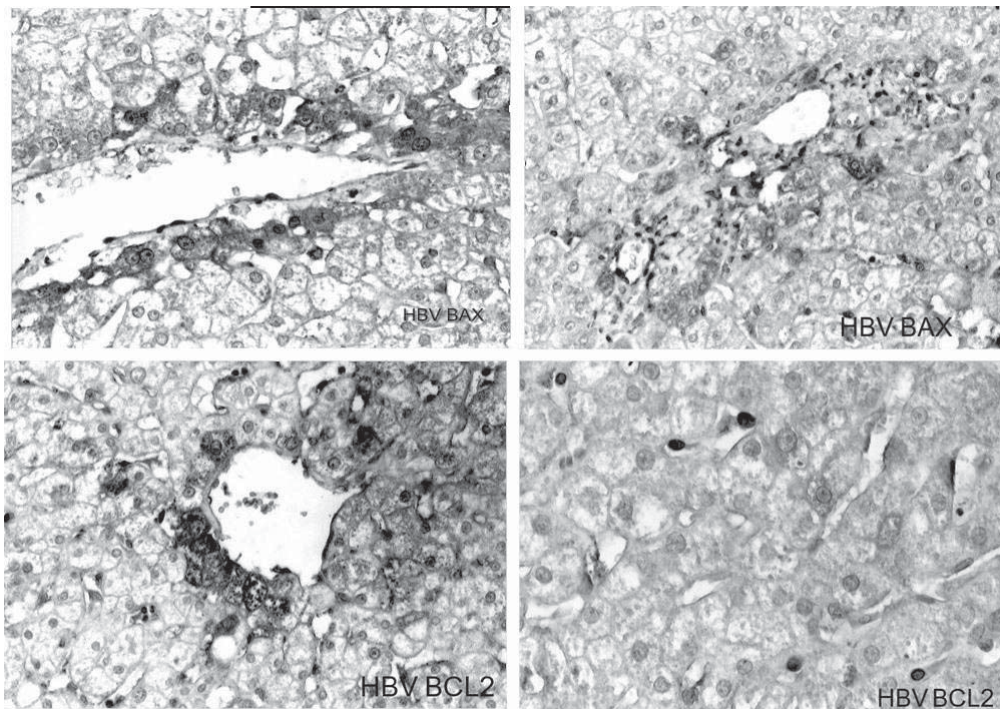
C-vírus okozta idült májgyulladás esetén az apoptózis hajlam a lebenyke széli részén található, valamint az elhalás és kötőszövetesedés körüli határzóna májsejtjeiben okozott BAX-pozitivitást. Apoptóssal szemben ellenálló, tehát BCL2-pozitív májsejteket a májlebenyke széli részén, BAX-pozitív sejtekkel váltakozva, sikerült kimutatni. BCL2-pozitívoknak bizonyultak az interlobularis cholangiocyták és a sinusoidok körüli orsósejtek is (**3. ábra**).

Mindkét tanulmányozott fehérjeféleség a B-sejtes lymphoma 2 (BCL2) pro- és antiapoptotikus mitochondriális fehérjék csoportjába tartozik [10]. Általános tulajdonságuk, hogy nyílásokat (pórusokat) képeznek a mitochondrium hártáján és ezt úgy érik el, hogy két molekula egyesülésével elegendően nagy fehérjét hoznak létre, ahhoz, hogy átérjék a kettős, féligáteresztő hártya vastagságát, tehát diméreket képeznek. A dimérek hetero-, vagy homodimérek lehetnek, tehát BAX-BAX, BCL2-BAX és BCL2-BCL2 diméreképzésre van lehetőség. A BAX-BAX dimérek fokozzák az apoptósinhajlamot, proapoptotikus hatással rendelkeznek, míg a BAX-BCL2, illetve a BCL2-BCL2 diméreknek apoptósis csökkentő vagy gátló, tehát antiapoptotikus hatásuk van [12]. Egy sejt apoptotikus hajlamát tehát ezen dimérek aránya határozza meg.

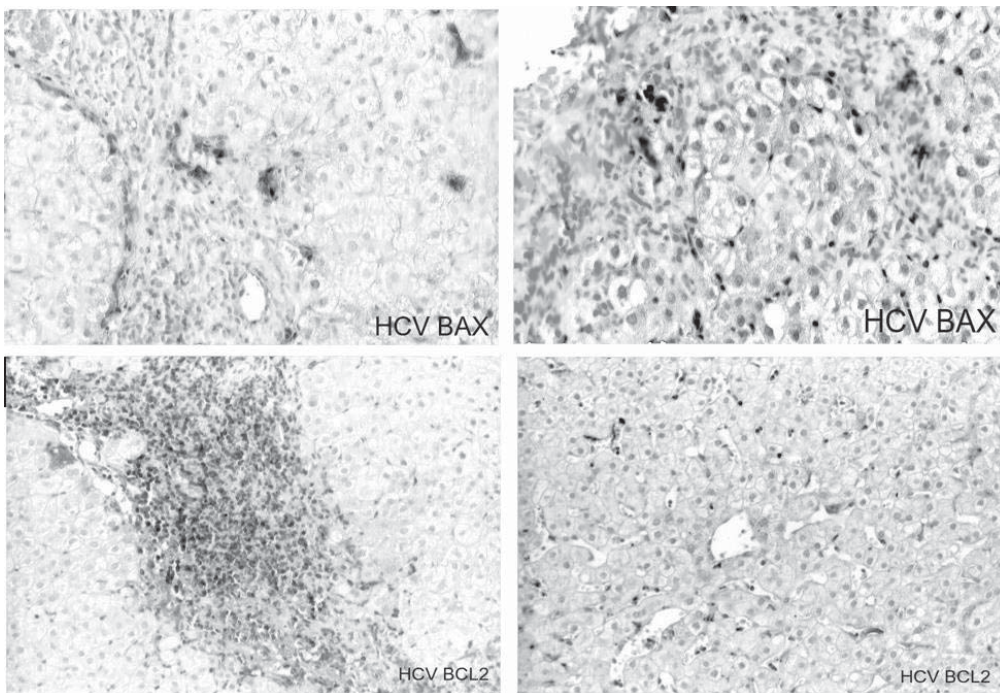
Alkoholos hepatitisben a pericentrolobularis BAX pozitívitas legelfogadhatóbb magyarázatát az a kísérletesen, emberi és állati eredetű májsejttenyészeteken, megfigyelt jelenség adja, hogy az apoptósiszt ugyanaz a CYP2E1 citokróom, P450 enzim váltja ki, amely döntő fontosságú az alkohol lebontásában is [9]. A sinusoid mentén elhelyezkedő májsejtek bontó tevékenységének eredményeként az alkoholból acetaldehid keletkezik, hatására aktiválódik ez a citokróom. Logikusnak tűnik, hogy a zsírosodáshoz vezető mechanizmus alapján a fokozott apoptósis hajlamot jelző BAX pozitívitas is pericentrolobulárisan legyen a legkifejezettebb. Az „alkoholstressz” a májsejtek érzékenységét növeli a sejtek kiváltotta lízis iránt és fokozza a természetes ölü T-sejtek aktivitását, ami az apoptósisról eltérő mechanizmusok fokozódására is felhívja a figyelmet [8].

B-vírus okozta idült májgyulladás esetén a reaktív nyiroksejtek száma és típusa a szervezet reakcióképessége szerint változik és arra utal, hogy a beteg képes-e megbirkózni a vírussal, vagy nem. A talált BAX-pozitívitas az apoptotikus hajlam megjelenésével jelzi, hogy az ilyen szervezetek nem képesek megvédeni a májat a vírusok hatása ellen [2, 11]. A máj endothel sejtjeinek antigén-bemutató szerepét ismerve, immuncompetens sejtekként változtatják apoptotikus hajlamukat [7]. Szerepük lehet ezen a mechanizmuson keresztül májdaganatok kialakításában is [1].

A C-vírusnak mind pro-, mind pedig antiapoptotikus hatása is lehet [6]. Ezt a hatást immunsejtek közreműködésével, illetve az immunsejtektől függetlenül kiválthatja a C-vírus, vagy annak valamilyen fehérjeösszetevője. A C-vírus nagyon változékony fehérjeféleségeket tartalmaz, amelyeknek megfelelően egyetlen betegben több ún. quasispecies létezhet. Ezek hatása az apoptósisra érthető módon változó [4]. Külön szerepet tulajdonítanak a vele-



2. ábra. B-vírus okozta idült májgyulladás: apoptosis hajlamot jelező immunhisztokémiai jelenségek



3. ábra. C-vírus okozta idült májgyulladás: apoptosis hajlamot jellemző immunhisztokémiai jelenségek

született és szerzett információk alapján működő ún. innat- és acquired immune systemnek, amelyek közül a szerzett immunlehetőségek hibája teszi lehetővé a vírushordozást. A vírus hibalehetőségeken alapuló replikációs stratégiája lehetővé teszi az immunnyomás alatti gyors evolúciót, a vírusantigének tartós magas szintje pedig kimeríti az immunrendszert [3].

Irodalom

1. Berg M. et al. - *Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance*, Eur J Immunol, 2006, 36:2960–2970.
2. Chen M.T. et al. - *A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen*,

- Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:14913–14918.
3. Dustin L.B., Rice C.M. - *Flying under the radar: The immunobiology of hepatitis C*, Annu Rev Immunol 2007, 25:71-99.
 4. Fischer R., Baumert T., Blum H.E. - *Hepatitis C virus infection and apoptosis*, World J Gastroenterol, 2007, 28.13(36):4865-4872
 5. Kleiner D. E. - *The Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C: A View from the Other Side of the Microscope Semin Liver Dis.* 2005, 25(1):52-64.
 6. Kountouras C. J., Zavos C., Chatzopoulos D. - *Apoptosis in hepatitis*, Journal Cover 2003,10.5:335-343.
 7. Limmer A. et al. - *Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance*, Nat Med, 2000, 6:1348–1354.
 8. Minagawa M., Deng Q., Liu Z.X. et al. - *Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor-alpha during alcohol consumption*, Gastroenterology, 2004, 126(5):1387-1399
 9. Nagy P. - *Apoptosis a májban*, in Kopper L., Fésüs L. - *Apoptosis*, Medicina, Budapest, 2002, 355-383.
 10. Neuman M.G. - *Apoptosis in diseases of the liver*, Crit Rev Clin Lab Sci, 2001,38(2):109-166.
 11. Ross Lopes A. et al. - *Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8+ T cells in patients unable to control HBV infection*, J Clin Invest, Published online, 2008 April 8.
 12. Sternberg S. S. - *Histology for Pathologists*, Lippincott-Raven Ed, 1997, 3-25.