



М. А. Шишкін

## Патогістологічні та імуногістохімічні особливості прогресії хронічного вірусного гепатиту В

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** вірусний гепатит В хронічний, печінки зірчаста клітина, фібробласти.

З метою доповнити й узагальнити морфогенетичні критерії прогресії хронічного вірусного гепатиту В на підставі патогістологічних, імуногістохімічних і комп'ютерно-морфометричних досліджень трепанобіопсій печінки хворих та аналізу їхніх клініко-біохімічних даних для використання в патологоанатомічній діагностиці й прогнозуванні перебігу хвороби здійснили обстеження 50 пацієнтів. Встановили, що найточніше ступінь вірусного інфікування гепатоцитів у трепанобіоптатах печінки хворих на хронічний вірусний гепатит В визначає імуногістохімічне виявлення в них HBsAg і HBeAg, «матово-склоподібні» гепатоцити, які виявляють протягом мікроскопії, неповністю показують ступінь інфікування гепатоцитів. Наявність прямого, високого кореляційного зв'язку між кількістю інфікованих гепатоцитів із HBsAg та індексом гістологічної активності гепатиту дає підставу використовувати імуногістохімічне маркування HBsAg на ранніх етапах діагностики для прогнозування можливої прогресії хронічного гепатиту В у хворих із нормальним рівнем трансамінази у крові.

### Патогистологические и иммуногистохимические особенности прогрессии хронического вирусного гепатита В

М. А. Шишкин

С целью дополнить и обобщить морфогенетические критерии прогрессии хронического вирусного гепатита В на основе патогистологических, иммуногистохимических и компьютерно-морфометрических исследований трепанобиопсий печени больных и анализа их клинико-биохимических данных для использования в патологоанатомической диагностике и прогрессировании течения болезни обследовали 50 пациентов. Установлено, что наиболее точно степень вирусного инфицирования гепатоцитов в трепанобиоптатах печени больных хроническим вирусным гепатитом В определяет иммуногистохимическое обнаружение в них HBsAg и HBeAg, «матово-стекловидные» гепатоциты, которые отмечают при микроскопии, неполно отражают степень инфицирования гепатоцитов. Наличие прямой, высокой корреляционной связи между количеством инфицированных гепатоцитов с наличием HBsAg и индексом гистологической активности гепатита дает основание использовать иммуногистохимическое маркирование HBsAg на ранних этапах диагностики для прогнозирования возможной прогрессии хронического вирусного гепатита В у больных с нормальным уровнем трансаминаз в крови.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит В хронический, печени звездчатые клетки, фибробласты.

*Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики.* – 2015. – № 1 (17). – С. 93–95

### Pathohistological and immunohistochemical features of chronic viral hepatitis B

М. А. Shishkin

**Aim.** The paper contains the results of a comprehensive study of pathohistological and immunohistochemical liver biopsies of 50 patients with chronic hepatitis B in relation to clinical and biochemical parameters to improve the most significant microscopic criteria of chronic hepatitis B progression in liver trepanobiopstates of the patients.

**Methods and results.** It has been established that most accurate definition of the degree of viral infection of hepatocytes in the liver trepanobiopstates of the patients with chronic viral hepatitis B could be made by the immunohistochemical detection of HBsAg and HBeAg, «dull glasslike» hepatocytes revealed by microscopy not fully reflect the degree of hepatocytes' infection.

**Conclusion.** The presence of direct, high correlation between the number of infected hepatocytes with HBsAg and histological hepatitis activity index gives reason to use immunohistochemical labelling of HBsAg on the early stages of diagnostics in order to predict the possible progression of chronic viral hepatitis B in patients with normal level of transaminase.

**Key words:** Hepatitis B Chronic, Liver Stellate Cells, Fibroblasts.

*Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 1 (17): 93–95*

Вірусний гепатит В – захворювання, що надзвичайно поширене у світі. Вірус гепатиту В часто передається в перинатальному періоді, що потім призводить до хронічного стану хворого. Хворі на хронічний гепатит В мають відносно високий рівень вірусу у крові, а також інших рідин організму. Вірус гепатиту В, як вважають, передається у сто разів частіше, ніж ВІЛ, і в десять разів більше, ніж гепатит С. Найбільш ефективний шлях передачі гепатиту В – статевий і парентеральний, менше – внаслідок контакту слизових оболонок із зараженою кров'ю. Перинатальний шлях від матері до дитини залишається поширеною формою передачі вірусу [1].

У світі понад 2 млрд людей мають серологічні ознаки

поточного або попереднього інфікування вірусом гепатиту В (HBV) [2].

Гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК) є однією з п'яти провідних причин смерті від раку в людини. Вірус гепатиту В є найбільш поширеним збудником ГЦК у світі, особливо в районах, де поширені інфекції HBV: Азія, Африка, південна частина Східної та Центральної Європи, Близький Схід [3].

Незважаючи на сучасні методи лікування та діагностики вірусного гепатиту В, учені [4–6] шукають шляхи вирішення проблеми морфологічної діагностики цього складного захворювання.

Серед мікроскопічних критеріїв прогресії хронічного вірусного гепатиту В (ХВГВ) найменш вивченим є

морфогенез імунного клінгу гепатоцитів і деструкції печінки імунітатами портальних трактів, не встановлено роль активованих зірчастих клітин Купфера в цьому процесі, а також не з'ясовані наслідки імунітатами деструкції для прогресії хвороби.

#### Мета роботи

Доповнити й удосконалити морфогенетичні критерії прогресії хронічного вірусного гепатиту В на підставі патогістологічних, імуногістохімічних і комп'ютерно-морфометричних досліджень трепанобіопсій печінки хворих та аналізу їхніх клініко-біохімічних даних для використання в патологоанатомічній діагностиці й прогнозуванні перебігу хвороби.

#### Пацієнти і методи дослідження

У дослідження залучили 40 хворих на ХВГВ (11 жінок і 29 чоловіків), група умовного контролю – 10 (4 жінки і 6 чоловіків) пацієнтів із транзиторними гепатозами без клініко-біохімічних і патогістологічних ознак вірусного ураження печінки.

Діагностично-патоморфологічні маркери вірусного й імунітатами ушкодження печінки, а також морфогенез важкого фіброзу печінки визначили у трепанобіопсіях печінки хворих.

Голками Uni-Cut і BioCut 14-16G під контролем апарата УЗД Conbizon-320-5 Ultima-Pro-30 із використанням секторального й конвексного датчиків виконували черезшкірну трепанобіопсію печінки.

Для патоморфологічного й імуногістохімічного дослідження стовпчики трепанобіоптатів печінки фіксували в забуференому 10% формаліні й заливали в парафін. Досліджували серійні зрізи завтовшки 3 м.

Для мікроскопічного дослідження парафінові зрізи трепанобіоптатів печінки фарбували гематоксином та еозином, а також за трибарвним методом Масона і ван Гізона.

Ступінь активності та прогресії хронічного вірусного гепатиту в біоптатах печінки пацієнтів оцінювали шляхом розрахунку індексу гістологічної активності ІГА за R.G. Knodell і співавт. [7]; виразність фіброзу печінки визначали у градації METAVIR і V. Desmet і співавт. [8] у серійних парафінових зрізах, що забарвлені за ван Гізоном і Масоном.

Інфікування гепатоцитів вірусом гепатиту В визначали в парафінових зрізах непрямым імунопероксидазним методом із використанням антитіл до HBsAg і HBcAg та системи візуалізації DAKO EnVision. Для визначення кількості гепатоцитів, що інфіковані вірусом гепатиту В, підраховували число HBsAg-позитивних гепатоцитів в умовному стандартному полі зору мікроскопа при збільшенні 400.

Методом прямої комп'ютерної морфометрії в мікроскопі Ахіорпан 2 з відеокамерою DXС-151А і пакетом програм KS 200 оцінювали площі лімфоцитарної інфільтрації й фіброзу портальних трактів.

Кількісні результати опрацювали методом варіаційного статистичного аналізу середніх величин на персональному комп'ютері «Sempron 2800» із використанням програмного пакета STATISTICA 6.0 for Windows із наступним аналізом результатів. Обчислювали середню арифметичну величину (М), середнє квадратичне відхилення (SD) і стандартну помилку середньої ариф-

метичної (m). Вірогідність відмінностей величин, які порівнювали, визначали за допомогою критерію Стьюдента (Т). Достовірною мінімальною вірогідністю вважали  $p < 0,05$ . Виконали кореляційний аналіз із використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r) [9,10].

#### Результати та їх обговорення

При мікроскопічному дослідженні серійних гістологічних зрізів біоптатів печінки виявили характерні патогномонічні мікроскопічні ознаки ХВГВ: «пісочні» й вакуолізовані ядра гепатоцитів, «матово-склоподібні» гепатоцити, рідкісні й малоінтенсивні внутрішньоклітинні холестази, тільця Каунсільмена та вогнища імунітатами клітинного клінгу гепатоцитів, імунітатами клітинні інфільтрати в портальних трактах, а також так звані імунітатами клітинні «ступінчасті некрози» – імунітатами клітинні інфільтрати в портальних трактах, які проникали через пограничну пластинку в часточки печінки.

Відповідно до індексу гістологічної активності ХВГВ із мінімальною активністю (ІГА 1–3 бали) ідентифікували у біоптатах печінки у 35,8% пацієнтів, гепатит зі слабко вираженою активністю (ІГА 4–8 балів) – у 47,0% хворих, гепатит із помірною активністю (ІГА 9–12 балів) – у 8,6% осіб, гепатит із вираженою активністю (ІГА 13–18 балів) виявили у 8,6% хворих. У середньому індекс гістологічної активності ХВГВ у хворих становив  $10,10 \pm 0,41$  бала.

Встановили, що в печінці хворих на ХВГВ тільця Каунсільмена за морфологією є гепатоцитами у стані апоптозу. У гістологічних зрізах трепанобіоптатів печінки спостерігають різні етапи апоптозу гепатоцитів: конденсація хроматину, пікноз ядра й формування виступів каріолеми (ядро у вигляді тутової ягоди) при збереженому ядерці; конденсація та еозинофілія цитоплазми, каріорексис із формуванням внутрішньоклітинних апоптотичних тілець розтрошеного ядра, оточення зморщеного гепатоцита (тільця Каунсільмена) відростками макрофагів.

Встановили високу позитивну кореляцію між ІГА і площею імунітатами клітинної інфільтрації портальних трактів, коефіцієнт кореляції становив ( $r = +0,76$ ,  $p < 0,05$ ); водночас визначили переважання площі імунітатами клітинної інфільтрації портальних трактів над площею їх фіброзу ( $p < 0,05$ ).

Зіставляючи виразність морфологічних змін у печінці у хворих на ХВГВ із нормальним рівнем АЛТ та у хворих із підвищеним її рівнем виявили, що середній показник ІГА у хворих із нормальним рівнем ферментів становив  $6,87 \pm 0,09$  бала, а у хворих із гіперферментемією –  $7,41 \pm 0,1$  бала. При цьому вірогідних відмінностей між середніми показниками ІГА хронічного гепатиту у хворих основної і контрольної груп не виявили (коефіцієнт кореляції Пірсона  $r = +0,21$ ,  $p < 0,05$ ). Аналізуючи ступінь виразності фіброзу печінки у хворих на ХВГВ із нормальним і підвищеним рівнем АЛТ також не виявили вірогідних відмінностей (коефіцієнт кореляції Пірсона  $r = +0,35$ ,  $p < 0,05$ ). Під час морфологічного визначення ступеня інфікування гепатоцитів вірусом гепатиту В у хворих на ХВГВ шляхом паралельного кількісного аналізу наявності «матово-склоподібних» гепатоцитів у гістологічних зрізах печінки, забарвлених

гематоксиліном і еозином, та кількості гепатоцитів з імуногістохімічно визначеним HBsAg, виявили високий кореляційний зв'язок між індексом гістологічної активності ХВГВ і ступенем інфікування гепатоцитів із HBsAg (коефіцієнт кореляції Пірсона  $r = +0,81$ ,  $p > 0,05$ ), що дає змогу використовувати імуногістохімічне маркування HBsAg на ранніх етапах діагностики для прогнозування можливої прогресії ХВГВ у хворих із нормальним рівнем трансаміназ у крові.

Результати свідчать: рівень амінотрансфераз у крові хворих на ХВГВ не показує виразності ушкоджень печінки; ступінь виразності вірус-індукованих та імуноклітинних уражень печінки, ступінь активації колагенотворення і прогресії фіброзу у хворих на ХВГВ адекватніше показують результати патоморфологічного дослідження пункційної трепанобіопсії печінки.

## Висновки

Найточніше ступінь вірусного інфікування гепатоцитів у трепанобіоптатах печінки хворих на ХВГВ визначає імуногістохімічне виявлення в них HBsAg і HBcAg, «матово-склоподібні» гепатоцити, які виявляють протягом мікроскопії, неповністю показують ступінь інфікування гепатоцитів. Наявність прямого, високого кореляційного зв'язку між кількістю інфікованих гепатоцитів із HBsAg та індексом гістологічної активності гепатиту дає підставу використовувати імуногістохімічне маркування HBsAg на ранніх етапах діагностики для прогнозування можливої прогресії ХВГВ у хворих із нормальним рівнем трансаміназ у крові.

**Перспективи подальших досліджень.** Враховуючи результати дослідження, планується удосконалити та встановити нові патогістологічні та імуногістохімічні ознаки прогресії ХВГВ.

## Список літератури

1. Hepatitis B // Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease / eds. : F.C. Mooren. – Berlin ; Heidelberg : Springer, 2012. – P. 408.
2. Wursthorn K. Hepatitis B / K. Wursthorn // Springer Reference Innere Medizin. – 2014. – P. 1–8.
3. Chang M.-H. Prevention of Hepatitis B Virus Infection and Liver Cancer / M.-H. Chang // Recent Results Cancer Res. – 2014. – Vol. 193. – P. 75–95.
4. Usefulness of serum T3, and TSH as prognostic indicators for patients of acute-on-chronic liver failure with hepatitis B virus infection / Wu Yichen, Zhihong Wan, Shaoli You, Shaojie Xin // Hepatology International. – 2014. – Vol. 8. – Issue 1. – Suppl.: 23rd Annual Conference of APASL, March 12–15, 2014, Brisbane, Australia. – P. 3.
5. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels during the natural history of chronic hepatitis B (CHB): a Chinese perspective study / L. Zeng, J. Lian, J. Chen et al. // Hepatology International. – 2014. – Vol. 8. – Issue 1. – Suppl.: 23rd Annual Conference of APASL, March 12–15, 2014, Brisbane, Australia. – P. 32.
6. Comparative immune modulatory capacities of HBsAg, HBcAg, and HBsAg/HBcAg and their utility for development of therapeutic vaccines / S.M. Akbar, S. Chen, M. Al-Mahtab, Y. Hiasa // Hepatology International. – 2014. – Vol. 8. – Issue 1. – Suppl.: 23rd Annual Conference of APASL, March 12–15, 2014, Brisbane, Australia. – P. 32.
7. Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis / R.G. Knodell, K.G. Ishak, W.C. Black et al. // Hepatology. – 1981. – Vol. 1. – P. 431–435.
8. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C / The French METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. – 1994. – Vol. 20. – P. 15–20.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
10. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – [2 изд., перераб. и доп.]. – К. : Морион, 2001. – 408 с.

## References

1. (2012). Hepatitis B. *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*. F.C. Mooren (Eds). Berlin; Heidelberg: Springer.
2. Wursthorn, K. (2014) Hepatitis B. *Springer Reference Innere Medizin*, 1–8.
3. Chang, M.-H. (2014). Prevention of Hepatitis B Virus Infection and Liver Cancer. *Recent Results Cancer Res.*, 193, 75–95. doi: 10.1007/978-3-642-38965-8\_5.
4. Wu, Yichen, Wan, Zhihong, You, Shaoli, & Xin, Shaojie (2014). Usefulness of serum T3, and TSH as prognostic indicators for patients of acute-on-chronic liver failure with hepatitis B virus infection. *Hepatology International*, 8(1), 3. Brisbane, Australia.
5. Zeng, L. Y., Lian, J. S., Chen, J. Y., Jia, H. Y., Zhang, Y. M., Xiang, D. R., et al. (2014). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels during the natural history of chronic hepatitis B (CHB): a Chinese perspective study. *Hepatology International*, 8(1), 32. Brisbane, Australia.
6. Akbar, S. M., Chen, S., Al-Mahtab, M., & Hiasa, Y. (2014). Comparative immune modulatory capacities of HBsAg, HBcAg, and HBsAg/HBcAg and their utility for development of therapeutic vaccines. *Hepatology International*, 8(1), 32. Brisbane, Australia.
7. Knodell, R. G., Ishak, K. G., Black, W. C., Chen, T. S., Craig, R., Kaplowitz, N., et al. (1981). Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1, 431–435. doi: 10.1002/hep.1840010511.
8. (1994). Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 20, 15–20.
9. Реброва, О. Ю. (2002). *Statisticheskij analiz medicinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA [Statistical analysis of medical data. Application software package STATISTICA]*. Moscow: Media Sfera. [in Russian].
10. Lapach, S. N., Chubenko, A. V., Babich, P. N. (2001). *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem Excel [Statistical methods in biomedical research using Excel]*. Kyiv: Morion. [in Ukrainian].

## Відомості про автора:

Шишкін М.А., к. мед. н., доцент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: masiles@mail.ru.

## Сведения об авторе:

Шишкин М.А., к. мед. н., доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: masiles@mail.ru.

## Information about author:

Shishkin M.A., Ph.D., Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: masiles@mail.ru.

Надійшла в редакцію 28.01.2015 р.