

Ανίχνευση σωματίων Mallory σε ηπατικές βιοψίες μέσω ανοσοεντοπίσεως της ουμπικουϊτίνης: Σύγκριση με άλλες ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους

Ντ. Τηνιακού¹, D. Harrison², A.D. Burt², Χρ. Κίττας¹

Detection of Mallory bodies in liver biopsies by immunolocalization of ubiquitin: comparison with other histochemical and immunohistochemical methods

Tiniakos D.¹, Harrison D.², Burt A.D.², Kittas Chr.¹

¹Laboratory of Histology and Embryology, Medical School University of Athens, Greece,
²Department of Pathology, Royal Victoria Infirmary, University of Newcastle upon Tyne, U.K.

Aim: We have investigated ubiquitin expression in a range of liver diseases associated with Mallory body formation and have examined the value of ubiquitin immunohistochemistry in the routine assessment of liver biopsies by comparing this with other histochemical and immunohistochemical methods used for the detection of Mallory bodies.

Material and Method: Material was obtained from patients with alcoholic liver disease, primary biliary cirrhosis, amiodarone-induced injury, idiopathic non-alcoholic steatohepatitis and type II glycogenosis.

Results: Mallory bodies were immunoreactive with anti-ubiquitin (but not with anti-ubiquitin hydrolase PGP9.5) in all forms of liver disease except type II glycogenosis. Furthermore, anti-ubiquitin detected greater number of Mallory bodies than histochemical methods or immunostaining with anti-low molecular weight cytokeratin.

Conclusions: We conclude that ubiquitin is a component of Mallory bodies in liver diseases of diverse aetiology and that immunolabelling for this protein is a sensitive method for the detection of Mallory bodies in routinely-processed liver biopsies.

Key-words: Mallory body, liver biopsy, ubiquitin

¹Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, ²Department of Pathology, Royal Victoria Infirmary, University of Newcastle upon Tyne, U.K.

Υποβλήθηκε: 14.3.2001
Εγκρίθηκε: 20.4.2001

Σκοπός: Μελετήσαμε την έκφραση της ουμπικουϊτίνης (Ubiquitin) σε ηπατικές νόσους που σχετίζονται με το σχηματισμό σωματίων Mallory (ΣΜ) και εκτιμήσαμε την αξία της ανοσοϊστοχημικής ανίχνεύσεως της ουμπικουϊτίνης στη μελέτη της ηπατικής βιοψίας σε σχέση με άλλες ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ΣΜ.

Υλικό και Μέθοδος: Χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από 38 βιοψίες ήπατος με βελόνα από ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα προκληθείσα από χορήγηση αμιοδαρόνης, ιδιοπαθή μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα και γλυκογόνωση τύπου II. Οι τομές χρώσθηκαν ανοσοϊστοχημικά για την ανίχνευση της ουμπικουϊτίνης, της υδρολάσης της ουμπικουϊτίνης (PGP 9.5) και κερατινών χαμηλού μοριακού βάρους (X.M.B.). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι χρώσεις κυανού της χρωμοτρόπου ανιλίνης, τριχρωμική του Masson και Picro-Mallory.

Αποτελέσματα: Τα ΣΜ ανιχνεύθηκαν ανοσοϊστοχημικά με τη χρήση της αντιουμπικουϊτίνης σε όλες τις περιπτώσεις πλην της γλυκογόνωσης τύπου II, ενώ ήταν αρνητικά στην PGP 9.5. Με τη χρήση του αντισώματος εναντι της ουμπικουϊτίνης ανιχνεύθηκε μεγαλύτερος αριθμός ΣΜ απ' ό,τι με τις ιστοχημικές μεθόδους ή την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση κερατινών X.M.B.

Συμπεράσματα: Η ουμπικουϊτίνη αποτελεί συστατικό των ΣΜ σε ηπατικές νόσους ποικίλης αιτιολογίας και η ανοσοϊστοχημική ανίχνευσή της αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο για την ταυτοποίηση ΣΜ στις βιοψίες ήπατος.

Λέξεις-κλειδιά: σωματία Mallory, ουμπικουϊτίνη, βιοψία ήπατος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σωματία Mallory (ΣΜ) είναι υαλοειδή κυτταροπλασματικά έγκλειστα τα οποία συγκεντρώνονται στα ηπατοκύτταρα σε παθήσεις που χαρακτηρίζονται από βλάβη του κυτταροσκελετού¹. Με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης διακρίνονται μέσα στο κυτταρόπλασμα του ηπατοκυττάρου σαν ομοειδής ουσία με ομαλό, ανώμαλο ή κυκλικό περίγραμμα και ρόδινη χροιά. Τα ΣΜ περιέχουν διάφορους τύπους ενδιάμεσων νηματίων κερατίνης (κυρίως 8, 18, 19 και 20), από τις οποίες μερικές (κερατίνες 19, 20) δεν αγνωρίζονται στα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα². Η βιολογική σημασία των ΣΜ δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί και δεν είναι γνωστό εάν αποτελούν ένα επιφανόμενο ή εάν είναι υπεύθυνα για την έναρξη και τη συνέχιση της ηπατοκυτταρικής βλάβης³. Τα ΣΜ παρατηρούνται συνηθέστερα στις βιοψίες ήπατος ασθενών με αλκοολική ηπατίτιδα και κίρρωση (51-65%), αλλά ανιχνεύονται και σε περιπτώσεις νόσου του Wilson (25%), πρωτοπαθή χολική κίρρωση και κίρρωση μη αλκοολικής αιτιολογίας (24%), ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (23%), παχυσαρκία (8%) και δωδεκαδακτυλοειλεϊκή αναστόμωση (6%)^{4,5}.

Ερευνητικές μελέτες έδειξαν ότι στην αλκοολική ηπατική νόσο, τα ΣΜ περιέχουν άφθονη ουμπικουϊτίνη (ubiquitin), ένα πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους 8,5 kD, που σχετίζεται με το κυτταρικό στρες και είναι παρόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα⁶. Η ουμπικουϊτίνη θεωρείται σημαντική για την κυτταρική αντοχή σε καταστάσεις στρες, τη συντήρηση του κυτταροσκελετού και την αποδόμηση ανώμαλων και βραχύβιων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών⁷. Τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα που σχηματίζονται από καδίωση ενδιάμεσων κυτταροσκελετικών ινιδίων και χαρακτηρίζουν την ιστολογική εικόνα ορισμένων νευροεκφυλιστικών παθήσεων και μυοπαθειών περιέχουν συχνά ουμπικουϊτίνη^{8,9}.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης της ουμπικουϊτίνης και της υδρολάσης της, PGP 9.5, σε διάφορες ηπατικές νόσους του ανθρώπου που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ΣΜ. Επιπλέον, μελετήσαμε την αξία της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης της ουμπικουϊτίνης για την ανάδειξη ΣΜ σε ηπατικές βιοψίες σε σχέση με άλλες ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευσή τους.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήσαμε 38 βιοψίες ήπατος με βελόνα από ασθενείς με αλκοολική ηπατίτιδα και κίρρωση (n=26), πρωτοπαθή χολική κίρρωση (στάδιο 3 n=4, στάδιο 4 n=5), μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα προκληθείσα από χορήγηση αμιοδαρόνης (n=1), ιδιοπαθή μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (n=1) και γλυκογόνωση τύπου II (n=1). Το κριτήριο επιλογής των ανωτέρω περιπτώσεων ήταν η παρουσία αναγνωρίσιμων ΣΜ σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης (A&H). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες και 5 βιοψίες με βελόνα φυσιολογικού ήπατος ενηλίκου.

Όλοι οι ηπατικοί ιστοί ήταν μονιμοποιημένοι σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% και εγκλεισμένοι σε παραφίνη. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους 4μ. Πολυκλωνικοί αντιοροί χρησιμοποιήθηκαν για την εντόπιση της συμπικουϊτίνης (Dako, UK, αραιώση 1:1000), και της υδρολάσης της συμπικουϊτίνης PGP 9.5 (Ultraclone, UK, αραιώση 1:50) με τη μέθοδο υπεροξειδάσης-αντι-υπεροξειδάσης (PAP). Το μονοκλωνικό αντίσωμα 5D3 (Novocastra, UK, αραιώση 1:100) χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη κερατινών χαμηλού μοριακού βάρους (κερατίνες 8,18) με την ανοσοϊστοχημική τεχνική συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης (ABC).

Σε 8 περιπτώσεις αλκοολικής ηπατίτιδος διαδοχικές τομές χρώσθηκαν επίσης με τις ιστοχημικές χρώσεις κυανού της χρωμοτρόπου ανιλίνης (CAB), τριχρωμική του Masson (MT) και Picro-Mallory (PM).

Ο αριθμός των αναγνωρίσιμων ΣΜ με κάθε μέθοδο εκτιμήθηκε σε 30 οπτικά πεδία μεγάλης μεγεδύνσεως (αντικειμενικός φακός x40, Leitz Dialux 22EB, Germany).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

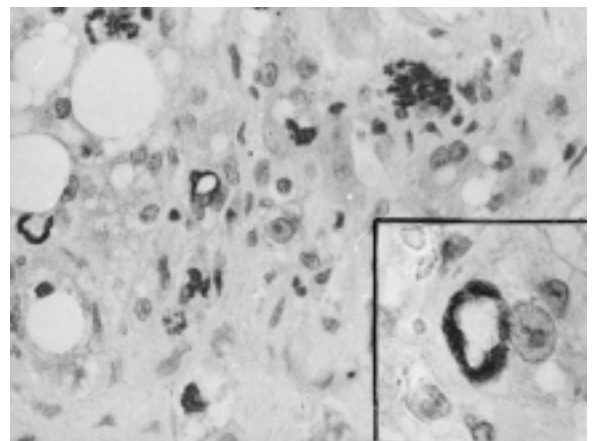
Τα ΣΜ παρουσίασαν δετική ανοσοχρώση με το αντίσωμα έναντι της συμπικουϊτίνης σε όλες τις περιπτώσεις, πλην της γλυκογόνωσης τύπου II στις οποίες και οι ιστοχημικές χρώσεις CAB, MT, PM δεν ταυτοποίησαν την παρουσία τους. Στα μικρά ΣΜ η ανοσοχρώση συμπικουϊτίνης ήταν ομοιογενής, ενώ στα περισσότερα από τα μεγαλύτερα παρατηρήθηκε έντονη χρώση περιφερικά ενώ το κέντρο τους είχε χρωσθεί ασθενώς (Εικόνα 1).

Σε όλες τις περιπτώσεις τα ΣΜ ήταν αρνητικά προς την υδρολάση της συμπικουϊτίνης

PGP 9.5. Η PGP 9.5 είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται στα νευροενδοκρινικά κύτταρα και, αντίθετα με τα ευρήματά μας στο ήπαρ, είναι παρούσα στα περιέχοντα συμπικουϊτίνη έγκλειστα σωματίδια που παρατηρούνται στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις του ανθρώπου¹⁰.

Σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε στα ηπατοκύτταρα πέριξ ινωδών διαφραγματίων και στα κύτταρα των χοληφόρων διάχυτη κοκκιώδης δετική χρώση προς την συμπικουϊτίνη και την PGP 9.5. Η δετικότητα στην συμπικουϊτίνη πιθανώς αντανάκλα τη σύζευξη αυτής της πρωτεΐνης με τα ενδιάμεσα νημάτια του κυτταροσκελετού, η οποία παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες¹¹. Η ανοσοϊστοχημική εντόπιση της PGP 9.5 στα περιδιαφραγματικά ηπατοκύτταρα και στα κύτταρα των χοληφόρων αγγείων πιθανώς να αντανάκλα τη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων, η οποία φαίνεται ότι λαμβάνει χώρα σε χολοστατικές ηπατικές νόσους¹².

Σε 13 περιπτώσεις, μερικά ΣΜ παρουσίασαν έντονη δετικότητα προς τις κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους 8 και 18 (αντίσωμα 5D3). Στα μεγαλύτερα από αυτά η κατανομή της ανοσοχρώσης ήταν παρόμοια με την της συμπικουϊτίνης. Τα ΣΜ ήταν δετικά προς το 5D3 μόνο στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκε δετική μεμβρανική χρώση και στα ηπατοκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαφορές στη μονιμοποίηση και την επεξεργασία είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ανοσοϊστοχημική



Εικόνα 1. Αλκοολική ηπατίτιδα. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση συμπικουϊτίνης σε σωματίδια Mallory, τα μεγαλύτερα από τα οποία εμφανίζουν περιφερικά εντονότερη χρώση (ένδεδτο). Μέθοδος PAP, χρωμογόνο DAB, X100, x400.

ανάδειξη των κερατινών χαμηλού μοριακού βάρους.

Στις 8 περιπτώσεις όπου εξετάσθηκαν διαδοχικές τομές με την ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της ουμπικουΐτινης, ταυτοποιήθηκαν μεγαλύτεροι αριθμοί ΣΜ σε σχέση με τις ιστοχημικές χρώσεις ή τη χρώση των κερατινών χαμηλού μοριακού βάρους (Πίνακας 1). Το εύρημα αυτό είναι δυνατόν να οφείλεται στην παρουσία ανοσοδραστικής ουμπικουΐτινης σε μικρά ΣΜ ή πρόδρομες μορφές ΣΜ, τα οποία είναι δύσκολο να διαγνωσθούν σε ιστικές τομές με τις συνήθεις τεχνικές¹³.

Στο φυσιολογικό ήπαρ, δεν παρατηρήθηκε παρουσία ουμπικουΐτινης. Η PGP 9.5 εντοπίσθηκε μόνο σε νευρικούς κλάδους και οι κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους 8 και 18 στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων των χοληφόρων αγγείων.

Η μελέτη μας απέδειξε ότι η ουμπικουΐτινη

αποτελεί συστατικό των ΣΜ σε ηπατικές νόσους ποικίλης αιτιολογίας. Σύμφωνα με την εμπειρία μας, η ανίχνευση των ΣΜ στις ηπατικές βιοψίες με τη χρήση πολυκλωνικού αντιορού έναντι της ουμπικουΐτινης είναι σημαντικά ευκολότερη σε σχέση με τη χρήση ειδικών ιστοχημικών τεχνικών ή την ανοσοχρώση με αντισώματα προς τις κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους. Με την τελευταία, μια συχνή δυσκολία που αντιμετωπίσθηκε κατά τη μελέτη της βιοψίας ήταν η επιπρόσδετη χρώση των ηπατοκυττάρων, ενώ με τις ιστοχημικές τεχνικές παρατηρούντο συχνά δομές με αμφίβολη χρώση σε ένα πολύχρωμο υπόστρωμα.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση ουμπικουΐτινης αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση των ΣΜ και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στο φάσμα των ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ιστολογική διάγνωση των ηπατικών βιοψιών.

Πίνακας 1. Αριθμός σωματίων Mallory (ανά 30 οπτικά πεδία μεγάλης μεγεθύνσεως) σε διαδοχικές τομές 8 ηπατικών βιοψιών με αλκοολική ηπατίτιδα χρωσθείσες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (A&H), κυανού της χρωμοτρόπου ανιλίνης (CAB), τριχρωμική χρώση του Masson (MT), Picro-Mallory (PM) και με ανοσοχρώσεις ειδικές προς την ουμπικουΐτινη (Ουμπικ) και τις κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους (5D3).

Περίπτωση	A & H	CAB	MT	PM	Ουμπικ.	5D3
1	6	11	7	11	128	0
2	78	64	54	42	240	71
3	30	44	25	30	212	62
4	81	180	211	194	905	462
5	6	19	4	4	73	0
6	13	51	11	7	457	35
7	15	50	12	9	209	2
8	69	41	21	45	440	37

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- French SW. Present understanding of the development of Mallory's body. Arch Pathol Lab Med 107:445-450, 1983.
- Schirmacher P, Dienes HP, Moll R. De novo expression of nonhepatocellular cytokeratins in Mallory body formation. Virchows Arch 432:141-152, 1998.
- Jensen K, Gluud C. The Mallory body: Morphological, clinical and experimental studies. Hepatology 20:1061-1077, 1994.
- De la M, Hall P. Alcoholic liver disease. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portmann B (eds) Pathology of the liver, 3rd ed. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, New York, 1994:317-348.
- Jensen K, Gluud C. The Mallory body: Theories on the development and pathological significance. Hepatology 20:1330-1342, 1994.
- Ohta M, Marceau N, Perry G, et al. Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory bodies of hepatocytes. Lab Invest 59:848-856, 1988.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 67:425-479, 1998.
- Arnold J, Dawson S, Ferguson J, Lowe J, Landon M, Landon RJ. Ubiquitin and its role in neurodegeneration. Prog Brain Res 117:23-34, 1998.
- Goebel HH. Congenital myopathies with inclusion bodies: a brief review. Neuromuscul Disord 8:162-168, 1998.

10. Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol* 161:153-160, 1990.
11. Vyberg M, Leth P. Ubiquitin: an immunohistochemical marker of Mallory bodies and alcoholic liver disease. *APMIS suppl* 23:46-52, 1991.
12. Roskams T, van den Oord JJ, De Vos R, Desmet VJ. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *Am J Pathol* 137: 1019-1025, 1990.
13. Ray MB. Distribution patterns of cytokeratin antigen determinants in alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Human Pathol* 18:61-66, 1987.

Corresponding author

D. Tiniakos, MD, PhD

Lab. of Histology and Embryology

Medical School, Athen's University

75 Mikras Asias str.

11527 Athens, Greece

Tel.: +3 0107796425, FAX: +3 0107462340