



CrossMark

PATHOHISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF STEATOHEPATITIS ON NEEDLE BIOPSY SAMPLE FROM 100 PATIENTS

PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE STEATOHEPATITISA DOBIJENE METODOM IGLENE BIOPSIJE NA UZORKU OD 100 PACIJENATA

Anđela Milićević¹, Nevena Lazović¹, Nada Tomanović²

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

² Institut za patologiju "Dr Đorđe Joannović", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Correspondence: andjela1204@hotmail.com

Abstract

Introduction: Steatohepatitis is a form of fatty liver disease, in which there is a deposit of fat and steatosis which occurs in two forms: alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. When there is simultaneous inflammation, it is defined as steatohepatitis, which can be divided into alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. Alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis show identical morphological features characterized by steatosis, hepatocellular changes with ballooning degeneration of hepatocytes, the presence of Mallory-Denk hyaline, apoptosis, necrosis, subsequent inflammation of the liver parenchyma and fibrosis.

Aim: The aim of this paper is to record all pathohistological changes in puncture biopsy patterns of the liver of patients with steatohepatitis, grading these changes and determining their correlation with the age and sex of patients, as well as the correlation of the most important pathohistological changes.

Material and methods: Retrospective research included core needle biopsy from the right lobe of the liver, in patients with pathohistological diagnosis of steatohepatitis. For statistical data processing Spearman's and Chi-squared test in the SPSS program were used, and $p < 0.05$ was used as the minimum statistically significant value.

Results: Our research included 100 respondents from alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis, 62% males and 38% females. Necroinflammatory activity was significantly greater in respondents with greater volume of steatosis. There is also a positive correlation between the degree of necroinflammatory activity and the degree of fibrosis. Higher necroinflammatory activity is associated with a higher degree of fibrosis.

Conclusion: In our research, most of the respondents had steatohepatitis of minimal activity and without fibrosis or with light fibrosis. Respondents with a higher volume of steatosis had higher necroinflammatory activity in the liver. Respondents with steatohepatitis and greater necroinflammatory activity also had a higher stage of the disease (a higher degree of fibrosis). The age and sex of respondents were not correlated with the degree of fibrosis.

Keywords:

steatohepatitis,
steatosis,
NAFLD,
NASH,
ASH



Sažetak

Uvod: Steatohepatitis predstavlja oblik masne bolesti jetre u kojoj dolazi do deponovanja masti i steatoze i koja se javlja u dva oblika: kao alkoholna i nealkoholna masna bolest jetre. Ako postoji istovremeno i zapaljenje onda se definiše kao steatohepatitis, koji može da se podeli na alkoholni i nealkoholni steatohepatitis. Alkoholni i nealkoholni steatohepatitis pokazuju jednake morfološke karakteristike koje se odlikuju steatozom, hepatocelularnim promenama sa baloniranjem hepatocita, prisustvom Malori-Denkovich (*Mallory-Denk*) hijalina, apoptozom, nekrozom, posledičnim zapaljenjem jetrinog parenhima i fibrozom.

Cilj: Ciljevi ovog rada su evidentiranje svih patohistoloških promena u punkcionim biopsijama jetre pacijenata sa steatohepatitisom, gradiranje tih promena i određivanje njihove korelacije sa životnom dobi i polom pacijenata, kao i međusobne korelacije najvažnijih patohistoloških promena.

Materijal i metode: U retrospektivno istraživanje uključene su iglene biopsije iz desnog režnja jetre pacijenata sa patohistološkom dijagnozom steatohepatitisa. Za obradu statističkih podataka korišćeni su Spearman i Hi-kvadrat test u programu SPSS, a kao minimalna statistički značajna vrednost korišćena je vrednost $p < 0,05$.

Rezultati: Našim istraživanjem obuhvaćeno je 100 ispitanika obolelih od alkoholnog i nealkoholnog steatohepatitisa, 62% muškog i 38% ženskog pola. Prosečna starost ispitanika iznosila je 52 godine. Postoji slaba pozitivna korelacija stepena nekroinflamatorne aktivnosti i krupnokapljičaste masne promene. Veća nekroinflamatorna aktivnost je povezana sa većim obimom steatoze. Postoji osrednja pozitivna korelacija stepena nekroinflamatorne aktivnosti i stepena fibroze. Veća nekroinflamatorna aktivnost je povezana sa većim stepenom fibroze.

Zaključak: U našim istraživanjima zaključili smo da je najveći broj ispitanika imao steatohepatitis minimalne aktivnosti i bio bez fibroze ili sa lakom fibrozom. Ispitanici sa većim obimom steatoze imaju i veću nekroinflamatornu aktivnost u jetri. Ispitanici sa steatohepatitisom i većom nekroinflamatornom aktivnošću imaju i viši stadijum bolesti (veći stepen fibroze). Uzrast i pol ispitanika nisu u korelaciji sa stepenom fibroze.

Ključne reči:

steatohepatitis,
steatoza,
NAFLD,
NASH,
ASH

Uvod

Steatohepatitis predstavlja oblik masne bolesti jetre. Postoje dve osnovne vrste masne bolesti jetre: alkoholna (engl. *alcoholic liver disease*, ALD) i nealkoholna masna bolest jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) (1). U ovim bolestima dolazi do deponovanja masti u jetri, što se naziva masna promena ili steatoza. Kada u tkivu jetre istovremeno postoji i zapaljenje onda se ono definiše kao steatohepatitis, koji može da se podeli na alkoholni steatohepatitis (engl. *alcoholic steatohepatitis*, ASH) i nealkoholni steatohepatitis (engl. *non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) (2,3). Nealkoholna masna bolest jetre nedavno je postala jedna od najčešćih netumorskih bolesti jetre i danas je smatramo hepatičnom manifestacijom metaboličkog sindroma, koja je usko povezana sa gojaznošću i tipom 2 dijabetesa melitusa. Čini se da visceralna mast igra ulogu u napredovanju NAFLD zbog njene sposobnosti da aktivira mnoštvo različitih adipokina kao što su faktor nekroze tumora, interleukin 6, makrofagni hemoatraktantni protein 1 i rezistin, koji promovišu rezistenciju na insulin i pojavu tipa 2 dijabetesa melitusa (2). Nedavno je istraživanje pokazalo da insulinska rezistencija može da bude prediktor histoloških promena u jetri, a kod pacijenata koji već pate od NAFLD i mogući prediktor napredovanja fibroze (2).

Alkoholni steatohepatitis i NASH pokazuju gotovo potpuno jednake morfološke karakteristike koje se

odlikuju steatozom, hepatocelularnim promenama sa baloniranjem hepatocita, prisustvom Malori-Denkovich (MD) hijalina, apoptozom, nekrozom, posledičnim zapaljenjem jetrinog parenhima i fibrozom (2). Diferencijacija ove dve bolesti je moguća samo potvrđivanjem ili isključivanjem zloupotrebe alkohola. Postoje dva tipa masne promene: krupnokapljičasta i sitnokapljičasta. Kod krupnokapljičaste masne promene jedna velika masna kap ili manje, dobro definisane kapljice masti zauzimaju citoplazmu hepatocita, gurajući jedro na periferiju. Kod sitnokapljičaste masne promene citoplazma hepatocita je ispunjena sitnim kapljicama lipida, a jedro se nalazi centralno u ćeliji (3). Baloniranje hepatocita je povezano sa poremećajem normalnog citoskeleta keratina i intermedijarnih filamenata, što značajno doprinosi ireverzibilnom oštećenju ćelija. Megamitohondrije su eozinofilne strukture u citoplazmi hepatocita i definišu se kao uvećane mitohondrije vidljive pod svetlosnim mikroskopom. U patogenezi ASH glavnu ulogu imaju slobodni radikali koji nastaju prilikom enzimske razgradnje alkohola u hepatocitima i dovode do oksidativnog stresa i peroksidacije koji vode u inflamaciju (4,5), dok je kod NASH vodeća teorija „dva udarca“. „Prvi udarac“ je nakupljanje triglicerida ili steatoza jetre, a „drugi udarac“ je oštećenje jetre posredovano inflamatornim citokinima, mitohondrijalnom disfunkcijom i oksidativnim stresom, što za posledicu ima razvoj steatohepatitisa i fibroze jetre (3-6).

Kako klinička manifestacija nije karakteristična, biopsija jetre predstavlja zlatni standard za dijagnostiku ovih oboljenja. S obzirom na to da je biopsija invazivna metoda, uvedeno je nekoliko neinvazivnih metoda u koje spadaju vizualizacione tehnike kao što su ultrasonografija jetre, magnetna rezonanca i merenje serumskih markera poput alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST). Biopsija jetre omogućava postavljanje dijagnoze NAFLD, razlikovanje obične steatoze od steatohepatitisa i procenu stepena steatoze, aktivnosti hepatitisa (stepena nekroinflamatorne aktivnosti) i stadijuma bolesti (stepena fibroze). Razlika između steatoze i steatohepatitisa je važna jer je manja verovatnoća da steatoza dovodi do teških komplikacija u tkivu jetre, dok steatohepatitis može dovesti do ciroze jetre i hepatocelularnog karcinoma (2-6).

Ciljevi ovog rada su evidentiranje svih patohistoloških promena u punkcionim biopsijama jetre pacijenata sa steatohepatitisom, gradiranje tih promena i određivanje njihove korelacije sa životnom dobi i polom pacijenata, kao i međusobne korelacije najvažnijih patohistoloških promena.

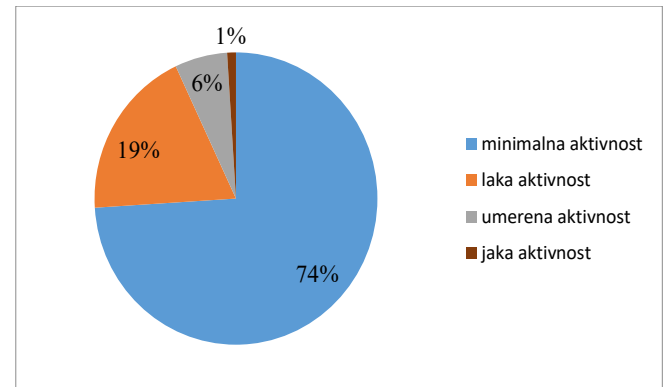
Materijal i metode

U retrospektivno istraživanje uključeni su svi pacijenti sa patohistološkom dijagnozom steatohepatitisa iz arhive Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 1.1.2014. godine do 31.12.2016. godine. U studiju su uključene iglene biopsije uzete iz desnog režnja jetre. Analizirani su podaci o polu, uzrastu, steatozi (masnoj promeni), stepenu nekroinflamatorne aktivnosti, stepenu fibroze (stadijumu) i drugim opisanim parametrima (postojanju MD hijalina, mitohondriozni, megamitohondrijama, baloniranju hepatocita). Rezultati su prikazani metodom deskriptivne i analitičke statistike. Za potrebe statističke obrade podataka korišćeni su *Spearman* i *Hi-kvadrat* test u programu *SPSS*, a kao minimalna statistički značajna vrednost korišćena je vrednost $p < 0,05$.

Rezultati

Našim istraživanjem obuhvaćeno je 100 ispitanika obolelih od ASH i NASH, 62 (62%) muškog i 38 (38%) ženskog pola. Prosečna starost ispitanika iznosila je 52 godine ($\pm 47,63$). Najmlađi oboleli imao je 10, a najstariji 79 godina. Najstariji ispitanik muškog pola imao je 66, a najmlađi 10 godina; najstariji ispitanik ženskog pola imao je 79, a najmlađi 32 godine. Poređenjem ovih rezultata sa

stepenom fibroze našli smo da nema statistički značajne korelacije pola i stepena fibroze, kao ni statistički značajne korelacije uzrasta i stepena fibroze. Najveći broj ispitanika (74) imao je steatohepatitis minimalne aktivnosti, 19 ispitanika imalo je steatohepatitis lake, 6 umerene i 1 jake aktivnosti (**grafikon 1**).



Grafikon 1. Raspodela ispitanika prema aktivnosti steatohepatitisa

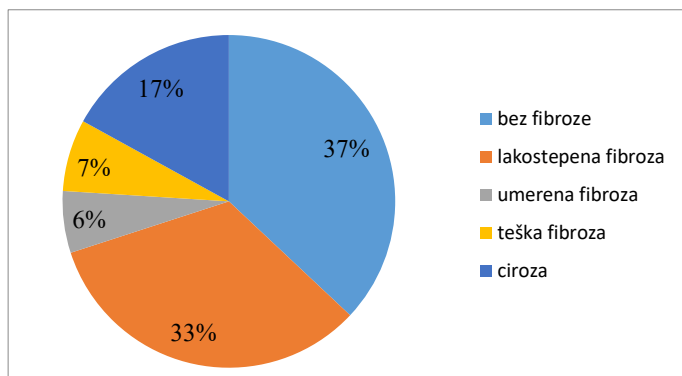
Od 74 ispitanika sa minimalnim stepenom nekroinflamatorne aktivnosti, 30 (40,5%) je bilo bez fibroze, 26 (35,1%) sa lakom fibrozom, 3 (4,1%) sa umerenom, 3 (4,1%) sa jakom i 12 (16,2%) sa cirozom. Od 19 ispitanika sa lakim stepenom nekroinflamatorne aktivnosti, 7 (36,8%) ih je bilo bez fibroze, 6 (35,3%) je imalo laku fibrozu, 2 (11,7%) umerenu, 1 (5,9%) tešku fibrozu, a 3 (17,6%) ispitanika bila su sa cirozom. Od 6 ispitanika sa umerenim stepenom nekroinflamatorne aktivnosti, 1 (16,7%) je imao umerenu fibrozu, 3 (50%) tešku fibrozu, a 2 (33,3%) cirozu. Jak stepen nekroinflamatorne aktivnosti imao 1 ispitanik i on je imao laku fibrozu. Postoji slaba pozitivna korelacija stepena nekroinflamatorne aktivnosti i krupnokapljičaste masne promene. Veća nekroinflamatorna aktivnost je povezana sa većim obimom steatoze ($rs = 0,224$; $p = 0,025$) (**tabela 1**).

Kod 99 (99%) ispitanika prisutna je krupnokapljičasta masna promena, a kod 11 (11%) i sitnokapljičasta. Hepatocelularno baloniranje, kao važna komponenta za dijagnozu steatohepatitisa, bilo je prisutno kod velikog broja naših ispitanika, 71 (71%).

Analizom stadijuma bolesti, 37 (37%) ispitanika je bilo bez fibroze, 33 (33%) sa lakostepenom fibrozom, 6 (6%) sa umerenom fibrozom, 7 (7%) sa teškom fibrozom i čak 17 (17%) sa cirozom jetre (**grafikon 2**).

Tabela 1. Vrednosti aminotransferaza ispitanika po otpustu

Nekroinflamatorna aktivnost	Bez fibroze	Laka fibroza	Umerena fibroza	Jaka fibroza	Ciroza	Broj ispitanika
Minimalna	30 (40,5%)	26 (35,1%)	3 (4,1%)	3 (4,1%)	12 (16,2%)	74
Laka	7 (36,8%)	6 (35,3%)	2 (11,7%)	1 (5,9%)	3 (17,6%)	19
Umerena			1 (16,7%)	3 (50%)	2 (33,3%)	6
Jaka		1				1
Br. ispitanika	37	33	6	7	17	



Grafikon 2. Raspodela ispitanika prema stepenu fibroze

Postoji osrednja pozitivna korelacija stepena nekroinflamatorne aktivnosti i stepena fibroze. Veća nekroinflamatorna aktivnost je povezana sa većim stepenom fibroze ($r_s = 0,309$; $p = 0,02$).

Nema statistički značajne korelacije fibroze i pojave baloniranja, megamitohondrija i steatogranuloma. Malori-Denkov hijalin nađen je kod 5 ispitanika i korelacija sa stepenom fibroze postoji ali nije statistički značajna.

Diskusija

Masna promena jetre (steatoza) obično ima blag klinički tok, dok je steatohepatitis progresivna bolest koja može napredovati u cirozu jetre i hepatocelularni karcinom (2-10). U izveštaju Američkog udruženja za proučavanje bolesti jetre objedinjene su histopatološke karakteristike steatohepatitisa. Minimalni kriterijumi za postavljanje histološke dijagnoze su: prisustvo steatoze (krupno > sitno), hepatocelularnog oštećenja (obično u vidu baloniranja hepatocita) i lobularnog zapaljenja (nekroinflamatorno oštećenje). Fibroza nije neophodna za dijagnozu steatohepatitisa, mada je obično prisutna (7).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da u uzorcima dominira krupnokapljičasta masna promena (99%) što je u skladu sa rezultatima sličnih publikovanih studija (3), u kojima 100% ispitanika ima prisutnu masnu promenu jetre. Takahaši (Takahashi) i saradnici navode da je u tkivu jetre veći obim steatoze u pozitivnoj korelaciji sa stepenom nekroinflamatorne aktivnosti (3), što je takođe u skladu sa našim rezultatima. Uz aktivnu nekroinflamatornu reakciju u NAFLD obično se posmatra i stepen fibroze. Naši rezultati pokazuju da je nekroinflamatorna aktivnost u korelaciji sa stepenom fibroze. U našem istraživanju je analizom stadijuma bolesti ustanovljeno da je 37% ispitanika bilo bez fibroze, 33% sa lakostepenom fibrozom, 6% sa umerenom fibrozom, 7% sa teškom fibrozom i 17% sa cirozom jetre. U studiji koju su publikovali Takahaši i saradnici 26% ispitanika je bilo bez fibroze, 30,43% sa lakostepenom fibrozom, 22% sa umerenom fibrozom, 17% sa teškom fibrozom i 4% ispitanika su bila sa cirozom jetre. U našim rezultatima je 74% ispitanika imalo steatohepatitis minimalne aktivnosti, 19% ispitanika imalo je steatohepatitis lake, 6% umerene i 1% jake aktivnosti; Takahaši i saradnici su u svojim rezultatima imali 9% ispitanika sa steatohepatitisom minimalne aktivnosti, 56% lake aktivnosti, 26% umerene i 9% jake aktivnosti. U

studijama koje su sproveli Angulo i saradnici 26% ispitanika nije imalo fibrozu, 37% je imalo lakostepenu fibrozu, 10% je imalo umerenu fibrozu, a 17% je imalo cirozu. Oni navode da obim steatoze i stepen nekroinflamatorne aktivnosti nisu u korelaciji sa stepenom fibroze jetre, a naši rezultati pokazuju pozitivnu korelaciju obima steatoze i nekroinflamatorne aktivnosti i nekroinflamatorne aktivnosti sa stepenom fibroze (9).

U rezultatima našeg istraživanja nije utvrđena statistička značajnost uzrasta i pola ispitanika i stepena fibroze, što je u skladu sa studijom koju su publikovali Dariani (Daryani) i saradnici (8). Teška fibroza i ciroza nađene su kod 26,32% ispitanika ženskog pola i 22,58% ispitanika muškog pola. U studiji Darianija i saradnika tešku fibrozu i cirozu imalo je 16,7% ispitanika ženskog pola, a 8,8% ispitanika muškog pola.

Uz mikrovezikularnu steatozu često se mogu videti megamitohondrije, koje predstavljaju eozinofilne strukture u citoplazmi hepatocita, tako da smo i njih uključili u naše istraživanje. Rezultati su pokazali da je samo 6 ispitanika imalo vidljive megamitohondrije. Prisustvo MD hijalina u baloniranim hepatocitima nije specifično, ali je korisno za dijagnozu steatohepatitisa. Oni se takođe primećuju kod drugih bolesti jetre, uključujući hroničnuolestazu i hepatocelularni karcinom (3). U našem istraživanju MD hijalin nađen je kod 5% ispitanika, dok su Angulo i saradnici u istraživanjima MD hijalin pronašli kod 31% ispitanika. Prisustvo MD hijalina u korelaciji je sa težinom fibroze jetre (9). U našem istraživanju korelacija nije statistički značajna.

Zaključak

U našim istraživanjima zaključili smo da je najveći broj ispitanika imao steatohepatitis minimalne aktivnosti i bio bez fibroze ili sa lakom fibrozom. Ispitanici sa većim obimom steatoze imaju i veću nekroinflamatornu aktivnost u jetri. Ispitanici sa steatohepatitisom i većom nekroinflamatornom aktivnošću imaju i viši stadijum bolesti (veći stepen fibroze). Uzrast i pol ispitanika nisu u korelaciji sa stepenom fibroze.

Literatura

1. Brunt EM, Tiniakos DG. Pathology of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2002;16(5):691-707.
2. Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9924-44.
3. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15539-48.
4. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. 2004;34(1):9-19.
5. Stickel F, Seitz HK. Update on the management of alcoholic steatohepatitis. *J Gastrointest Liver Dis*.

- 2013;22(2):189–97.
6. Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*. 2006;49(5):450–65.
 7. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37(5):1202–19.
 8. Daryani NE, Daryani NE, Alavian SM, Zare A, Fereshtehnejad S-M, Keramati MR, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and influence of age and gender on histopathologic findings. *World J Gastroenterol*. 2010;16(33):4169–75.
 9. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30(6):1356–62.
 10. Miele L, Forgione A, Gasbarrini G, Grieco A. Noninvasive assessment of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Transl Res*. 2007;149(3):114–25.