

Ūminio kepenų transplantato atmetimo diferencinė diagnostika iš bioptato

The differential diagnosis of acute liver allograft rejection in the biopsy

Aušrinė Barakauskienė¹, Arvydas Laurinavičius¹, Kęstutis Strupas², Arida Buivydienė², Vitalijus Sokolovas², Marius Paškonis², Jonas Valantinas², Jonas Jurgaitis²

¹ Valstybinis patologijos centras, P. Baublio g. 5, LT-08406 Vilnius

² Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Gastroenterologijos, urologijos ir abdominalinės chirurgijos klinika, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius

El. paštas: ausrine.barakauskiene@vpc.lt; jonas.jurgaitis@santa.lt

¹ National Centre of Pathology, P. Baublio g. 5, LT-08406 Vilnius, Lithuania

² Clinic of Gastroenterology, Urology and Abdominal Surgery, Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos, Santariškių str. 2, LT-08661 Vilnius, Lithuania

E-mail: ausrine.barakauskiene@vpc.lt; jonas.jurgaitis@santa.lt

Įvadas / tikslas

Atmetimo reakcijos morfologinių parametų pokyčių tikslus vertinimas gali užtikrinti ligonio gyvenimo kokybę po kepenų transplantacijos. Straipsnio tikslas yra pateikti ūminio kepenų transplantato atmetimo diferencinės diagnostikos iš bioptato literatūros apžvalgą ir pasidalyti savo praktine patirtimi vertinant nulinę kepenų biopsiją bei ūminę (ląstelinę) atmetimo reakciją bioptate.

Metodai

Straipsnyje apibendrinamos teorinės žinios, įgytos Heidelbergo universiteto Patologijos institute, dalyvaujant Leonardo da Vinčio projekto mokymo programoje „Kepenų transplantacijos įgūdžių tobulinimas“ 2006 m. balandį–birželį. Šios žinios susijusios su kepenų biopsijos taikymo ortotopinėje kepenų transplantacijoje prognozinė verte. Straipsnyje pateikiami morfologiniai vaistų sukelti pokyčiai ir apibendrinamas vaistų atsakas į gydymą.

Rezultatai

Remiantis asmenine patirtimi nurodoma nulinės biopsijos praktinė reikšmė, pateikiama ūminio (ląstelinio) atmetimo morfologinė diagnostika. Aprašomi ir šešiuose paveiksluose pavaizduojami šios reakcijos pagrindiniai komponentai, jų diferencinė diagnostika, nurodomi praktiški laipsniavimo sistemos principai.

Išvados

Atmetimo reakcija turi būti vertinama kompleksiskai – tai gastroenterologų, chirurgų, imunologų ir patologų komandos darbas. Gebėjimas kompleksiskai įvertinti ir interpretuoti tiek klinikinius, tiek morfologinius pokyčių parametrus gali užtikrinti ligonio gyvenimo kokybę po kepenų transplantacijos.

Pagrindiniai žodžiai: ortotopinė kepenų transplantacija, ūminė (ląstelinė) atmetimo reakcija, *Banff* schema, nulinė biopsija, atmetimo aktyvumo indeksas

Background / objective

Histological assessment of liver biopsies provides important information for the management of patients undergoing liver transplantation and for the differential diagnosis of other diseases. The aim of the article is to summarize the theoretical knowledge obtained from the University of Heidelberg at the Institute of Pathology participating in the Leonardo da Vinci project "Competence improvement in liver transplantation" in April–June 2006, and our own experience to determine acute (cellular) rejection, "time-zero" biopsy.

Results

There are three main morphological criteria of the rejection activity index to be evaluated: portal tract inflammation, bile duct damage and venous endothelial inflammation. The main histological features of acute (cellular) rejection are described and assessed in six pictures, and a practical approach to the scoring system (*Banff* scheme) is presented. In addition, there are described morphological changes caused by drugs as a response to treatment.

Conclusions

The assessment of acute (cellular) rejection should be carried out together with clinicians, surgeons, immunologists and pathologists working in team. The capability to evaluate all the clinical and morphological data in complex ensures the quality of life of the patient after liver transplantation.

Key words: liver allograft rejection, acute (cellular) rejection, *Banff* scheme, "time-zero" biopsy, rejection activity index

Įvadas

Pradėjus plačiau taikyti kepenų transplantaciją Lietuvoje, tiek patologams, tiek kliniciams iškilo svarbi praktinė problema, susijusi su nulinės biopsijos reikšme ir kepenų transplantato atmetimo reakcijos vertinimu.

Šiame straipsnyje apžvelgsime morfologinius pokyčius, kurie atsiranda pirmąjį mėnesį po ortotopinės kepenų transplantacijos (OKT). Daugiausia dėmesio skirsime ūminio (ląstelinio) atmetimo diferencinei diagnostikai, pasidalinsime savo patirtimi ir apibendrinsime teorines žinias, įgytas Heidelbergo universiteto Patologijos institute, 2006 m. balandį–birželį dalyvaujant Leonardo da Vinčio projekto mokymo programoje „Kepenų transplantacijos įgūdžių tobulinimas“.

OKT yra taikoma kaip gydymo rūšis, esant ūminiam ar poūmiam kepenų nepakankamumui, sergant kepenų ciroze, įgimtomis tulžies latakų ligomis, daugeliu metabolinių kepenų ligų ir kai kuriais pirminiais kepenų navikais [1]. Indikacijos atlikti kepenų transplantaciją skirstomos į tris grupes: nenavikinės

hepatobiliarinės ligos, pirminiai ar antriniai kepenų navikai, genetinės kilmės ligos.

Transplantato atmetimas yra imunologinis atsakas į išskiriamus svetimus antigenus, galintis pasireikšti persodinto organo pažeidimu [1–3]. Imuninei reakcijai, kuri būdinga visiems recipientams, kompensuoti taikoma imunosupresinė terapija, kurios morfologinė išraiška yra svarbi diferencinei atmetimo reakcijos diagnostikai [2]. Pagrindiniai kepenų transplantato atmetimo reakcijų tipai yra šie:

- humoralinė (sukelta antikūnų) atmetimo reakcija;
- ūminė (ląstelinė) atmetimo reakcija;
- lėtinė (duktopeninė) atmetimo reakcija.

Kepenų bioptato patologiniai pokyčiai yra labai svarbūs ligos prognozei persodinus kepenis įvertinti ir gydymo taktikai pasirinkti [2]. Pirmoje lentelėje nurodomos pagrindinės indikacijos atlikti kepenų biopsiją.

Bioptato pokyčiai po kepenų transplantacijos turi būti vertinami atsižvelgiant į tuo metu kepenų audinyje vykstančių patologinių biologinių procesų ir vais-

1 lentelė. Biopsijos taikymas kepenų transplantacijoje

Nulinė biopsija <ul style="list-style-type: none"> • pirminės donoro kepenų ligos nustatymas • pokyčių, susijusių su kepenų reperfuzija ir prezervacija, nustatymas
Transplantato disfunkcijos ištyrimas Kepenų transplantato atmetimas <ul style="list-style-type: none"> • ūminis atmetimas • lėtinis atmetimas
Pasikartojanti (rekurentinė) pirminė kepenų liga Tulžies latakų obstrukcija Kepenų arterijos ar venos trombozė Infekcija / sepsis Vaistų toksinis poveikis Potransplantacinės limfoproliferacinės ligos

tų poveikio sąveiką. Straipsnyje yra išdėstomi ankstyvi morfologiniai pokyčiai, kurie pasireiškia dažniausiai pirmąjį mėnesį po kepenų persodinimo.

Nulinė biopsija

Nulinė biopsija – svarbus morfologinis tyrimas, kuris atliekamas tuoj po kepenų reperfuzijos. Šiuo tyrimu svarbu morfologiškai nustatyti galimą pirminę donoro kepenų ligą. Kitas, beje, svarbiausias patologo uždavinys yra nustatyti steatozės laipsnį donoro kepenų bioptate. Steatozės laipsnis neturi viršyti 30–60% bioptato stulpelio. Svarbu atskirti, ar tai yra mikrovezikulinė, ar makrovezikulinė steatozė, nes tik pastaroji turi klinikinės reikšmės.

Humoralinė (antikūnų sukelta) atmetimo reakcija

Humoralinė (antikūnų sukelta) atmetimo reakcija – tai transplantato disfunkcija ir nepakanamumas, atsirandantys tuoj po reperfuzijos, kai recipiento kraujyje susidaro antidonorinių antikūnų [4, 5]. Po santykinai trumpos stabilios trasnsplantato būklės ši reakcija pasireiškia labai staigiu serumo aminotransferazių padaugėjimu kraujo serume, protrombino laiko pailgėjimu, o tai rodo akivaizdžią transplantato disfunkciją, kuri pasireiškia ūminiu kepenų nepakanamumu [6]. Pirminis nepakanamumas būdingas 3–8,5% transplantatų [7].

Histologiniai pokyčiai atsiranda tokia seka.

Po 2–6 valandų nuo transplantacijos:

- hepatiniuose sinusoiduose ir smulkiuose kraujagyslėse atsiranda fibrino, eritrocitų, trombocitų ir granulocitų sankaupos.

Po 1–2 dienų nuo transplantacijos:

- endotelio pažeidimas su išplitusia neutrofilemija, sudacija,
- pilnakraujystė,
- koaguliacinė hepatocitų nekrozė – masyvi hemoraginė nekrozė,
- nėra limfocitų infiltracijos.

Ūminė (ląstelinė) atmetimo reakcija

Ūminė (ląstelinė) atmetimo reakcija – tai imuninio tipo atsakas kepenų transplantate, pasireiškiantis ląsteline uždegimine kepenų vartų latakų infiltracija, tulžies latakų epitelio ir kraujagyslių endotelio pažeidimu [8]. Ūminio atmetimo diagnozės morfologinį substratą sudaro ląstelinė uždegiminė infiltracija kepenų audinyje, todėl terminas „ląstelinis atmetimas“ yra plačiai vartojamas kaip ūminio atmetimo sinonimas. Dar literatūroje paplitę terminai yra nedukto-peninis atmetimas, atmetimas be tulžies latakų išnykimo, ankstyvas atmetimas ir grįžtamas atmetimas [3].

Klinikinės savybės nėra specifinės, pasireiškia:

- pireksija,
- transplantato padidėjimu ir tempimo jausmu,
- tulžies nuotekio sutrikimu,
- cholestazinių rodiklių padidėjimu,
- leukocitoze,
- eozinofilija.

Dažnai padaugėja visų kepenų žymenų: bendrojo bilirubino, alanininės aminotransferazės, aspartato aminotransferazės, gama-glutamiltanspeptidazės ir šarminės fosfatazės. Periferiniame kraujyje dažnai yra smarki leukocitozė ir eozinofilija. Vis dėlto klinikiniai ir biocheminiai pokyčiai nėra specifiniai, todėl svarbus morfologinis kepenų bioptato tyrimas.

Pagrindiniai morfologiniai kriterijai, kurie rodo ūminę transplantato atmetimo reakciją, yra trys:

- kepenų vartų latakų infiltracija, vyraujant limfoblastams ar aktyviems limfocitams su neutrofilų ar eozinofilų priemaiša;

- tulžies latakų epitelio pažeidimas;
- subendotelinis venų uždegimas – endotelitas.

Pagal tarptautinį sutarimą turi būti bent du iš pirmiau išvardytų pokyčių, kad būtų galima diagnozuoti ūminį (ląstelinį) transplantato atmetimą, ir biocheminiai pokyčiai, patvirtinantys kepenų pažeidimą. Diagnozė tampa svaresnė, jei yra pažeista daugiau nei 50% kepenų vartų laukų arba diagnozuojamas smarkus kepenų vartų laukų ar centrinių venų endotelitas.

Esama nemažai atmetimo reakcijos laipsniavimo sistemų. Tarptautinė specialistų grupė pasiūlė *Banff* schemą [9]. Dabar ši schema yra paplitusi praktiškai vertinant ūminį kepenų transplantato atmetimą. Ją sudaro du pagrindiniai komponentai:

- visos atmetimo reakcijos raiškos laipsnio bendras įvertinimas;
- pusiau kiekybinis visų trijų pagrindinių atmetimo kriterijų įvertinimas, kurį išreiškia bendras kepenų transplantato atmetimo aktyvumo indeksas (AAI).

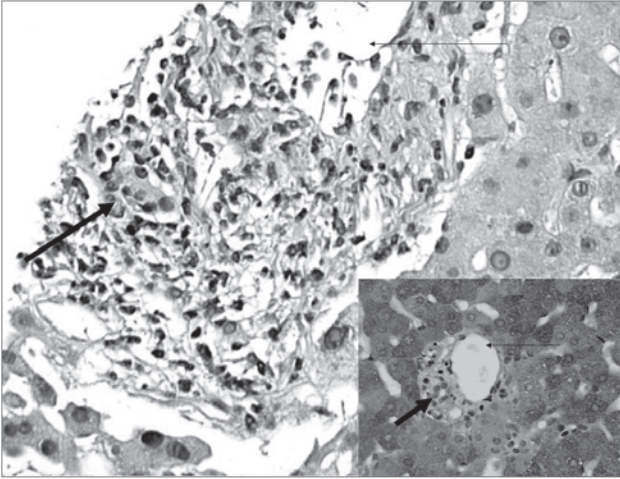
Iš pradžių bendrai įvertinama atmetimo reakcija kaip neapibrėžta, mažo laipsnio, vidutinio ir didelio laipsnio. Šis bendras įvertinimas yra pagrįstas pusiau kiekybiniais parametrais: vertinamas kepenų vartų laukų uždegimas, tulžies latakų pažeidimas ir endotelitas. Kiekvienas iš šių parametrų yra laipsniuojamas iki trijų, kaip parodyta 2 lentelėje. Visi laipsniavimo komponentai vėliau yra sudedami ir tokiu būdu iš-

2 lentelė. *Banff* schema – visos atmetimo reakcijos raiškos laipsnio bendras įvertinimas

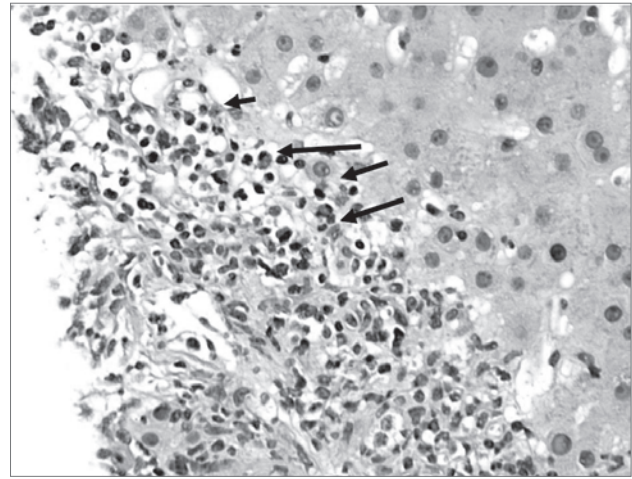
Bendras įvertinimas	Kriterijai
Neapibrėžtas	Kepenų vartų laukų uždegiminė infiltracija be aiškių atmetimui būdingų kriterijų
Mažo laipsnio (I)	Atmetimo infiltracija pavieniuose kepenų vartų laukuose / negausi / neplintanti į kepenų parenchimą
Vidutinio laipsnio (II)	Atmetimo infiltracija daugelyje / visuose kepenų vartų laukuose
Didelio laipsnio (III)	Atmetimo infiltracija daugelyje / visuose kepenų vartų laukuose, plintanti į kepenų parenchimą / perivenulinė hepatocitų nekrozė su uždegimine infiltracija

3 lentelė. Originali *Banff* schema – atmetimo aktyvumo indeksas [9]

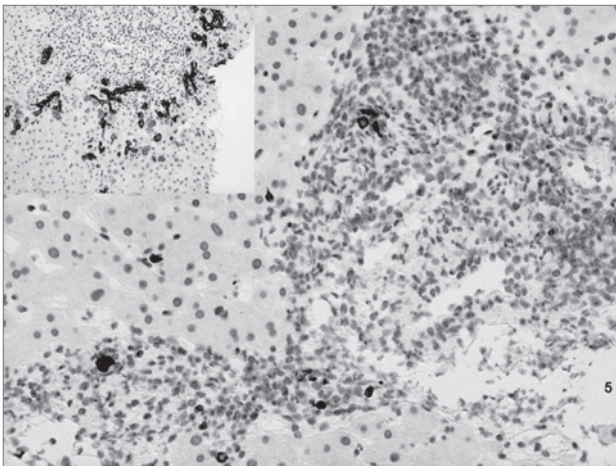
Grading of Acute Liver Allograft Rejection		
Global assessment of rejection grade made on a review of the biopsy and after the diagnosis of rejection has been established.		
Global Assessment*	Criteria	
<u>Indeterminate</u>	Portal inflammatory infiltrate that fails to meet the criteria for the diagnosis of acute rejection (see reference below)	
<u>Mild</u>	Rejection infiltrate in a minority of the triads, that is generally mild, and confined within the portal spaces	
<u>Moderate</u>	Rejection infiltrate, expanding most or all of the triads	
<u>Severe</u>	As above for moderate, with spillover into periportal areas and moderate to severe perivenular inflammation that extends into the hepatic parenchyma and is associated with perivenular hepatocyte necrosis	
* Verbal description of mild, moderate or severe acute rejection could also be labeled as Grade I, II and III, respectively		
Reference: Anonymous. Banff Schema for Grading Liver Allograft Rejection: An International Consensus Document. <i>Hepatology</i> 1997;25(3):638-63.		
REJECTION ACTIVITY INDEX (RAI)		
Criteria which can be used to score liver allograft biopsies with acute rejection, as defined by the World Gastroenterology Consensus Document.		
Category	Criteria	Score
Portal Inflammation	Mostly lymphocytic inflammation involving, but not noticeably expanding, a minority of the triads	1
	Expansion of most or all of the triads, by a mixed infiltrate containing lymphocytes with occasional blasts, neutrophils and eosinophils	2
	Marked expansion of most or all of the triads by a mixed infiltrate containing numerous blasts and eosinophils with inflammatory spillover into the periportal parenchyma	3
Bile Duct Inflammation Damage	A minority of the ducts are cuffed and infiltrated by inflammatory cells and show only mild reactive changes such as increased nuclear:cytoplasmic ratio of the epithelial cells	1
	Most or all of the ducts infiltrated by inflammatory cells. More than an occasional duct shows degenerative changes such as nuclear pleomorphism, disordered polarity and cytoplasmic vacuolization of the epithelium	2
	As above for 2, with most or all of the ducts showing degenerative changes or focal biliary disruption	3
Venous Endothelial Inflammation	Subendothelial lymphocytic infiltration involving some, but not a majority of the portal and/or hepatic venules	1
	Subendothelial infiltration involving most or all of the portal and/or hepatic venules	2
	As above for 2, with moderate or severe perivenular inflammation that extends into the periportal parenchyma and is associated with perivenular hepatocyte necrosis	3
Total RAI Score = /9		
Reference: Anonymous. Banff Schema for Grading Liver Allograft Rejection: An International Consensus Document. <i>Hepatology</i> 1997;25(3):638-63.		



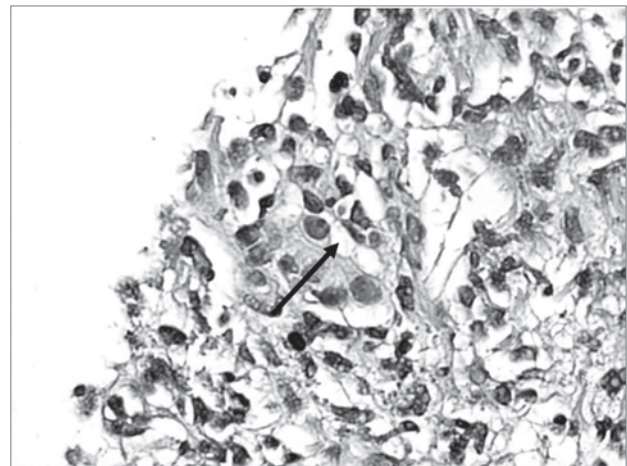
1 pav. Ūminis transplantato atmetimas. Kepenų vartų lauke – mišri infiltracija limfocitais, limfoblastais, eozinofilais be sandūros hepatitui būdingų požymių; intarpe pavaizduotas nepakitęs kepenų vartų laukas, HE \times 200



2 pav. Ūminis transplantato atmetimas. Kepenų vartų lauke matoma smarki eozinofilinė uždegiminė infiltracija, HE \times 200



3 pav. Ūminis transplantato atmetimas. Ląstelinei ūminio atmetimo reakcijai nėra būdinga kanalėlinė periportinių sričių reakcija, kuri palyginimui pavaizduota paveikslo intarpe, CK7 \times 200



4 pav. Ūminis transplantato atmetimas. Kepenų vartų lauke rodykle yra nurodytas pažeistas tulžies latakas, dėl gausios infiltracijos sunkiai atskiriamas pažeistas epitelis, HE \times 400

reiškia atmetimo aktyvumo indeksą (angl. *Rejection Activity Index*), kurio didžiausia suma yra 9.

Paprastai tariant, pokyčių raiškos laipsnis ir išplitimo kepenų vartų laukuose pobūdis yra vertinamas, kad atskirtume silpną nuo vidutinės raiškos transplantato atmetimo reakcijos. Smarkus perivenulinis uždegimas su aplinkine hepatocitų nekroze būdingas

didelio laipsnio atmetimo reakcijai, todėl lengvai atskiriamas nuo mažesnio laipsnio pažeidimo [2]. Originali *Banff* schema pateikiama 3 lentelėje.

Kepenų vartų laukų uždegiminė infiltracija

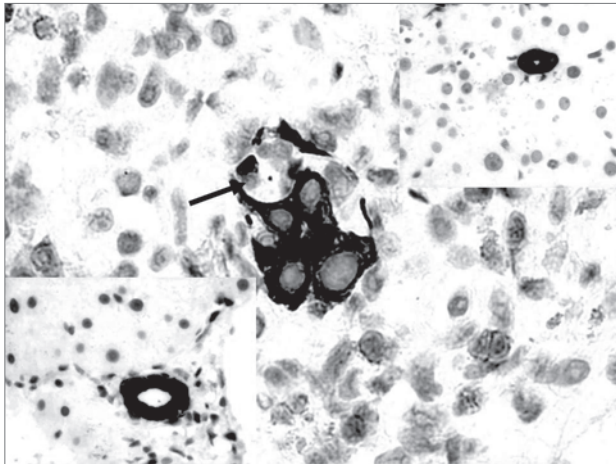
Kepenų vartų laukų infiltraciją sudaro limfocitai (vyrauja T limfocitai; kad būtų lengviau juos nustatyti,

galima naudoti papildomus imnohistocheminius CD3, CD4, CD8 žymenis), didelės blastų tipo ląstelės, makrofagai (CD68), neutrofilai ir eozinofilai. Smarki eozinofilinė infiltracija rodo galimą nepakankamą atsaką į imunosupresinę terapiją (1, 2 pav.) [10]. Uždegiminis infiltratas pažeidžia tarpuskiltelinių tulžies latakų epitelį ir endotelines ląsteles. Ląstelinei ūmi-

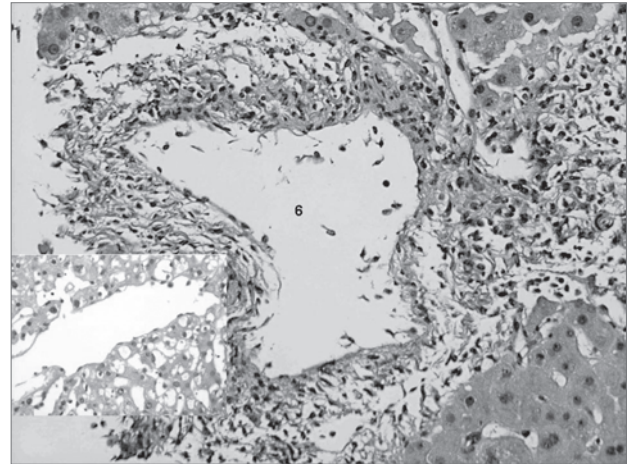
nei atmetimo reakcijai nėra būdinga duktalinė periportinių sričių reakcija (3 pav.).

Tulžies latakų pažeidimas

Tulžies latakai yra apsupti mišraus uždegiminio infiltrato, kartu ir neutrofilų. Tulžies latakų epitelis turi degeneracinių pokyčių – citoplazminę vakuolizaci-



5 pav. Ūminis transplantato atmetimas. Imunohistochemine citokeratino CK7 reakcija išryškintas tulžies latakų epitelio pažeidimas: intraepiteliniai limfocitai, citoplazmos vakuolizacija; dviuose paveiksluose intarpuose pavaizduoti nepakitę tulžies latakai, CK7 × 400



6 pav. Ūminis transplantato atmetimas. Centrinės venos endotelitas, kuris pasireiškia gausia monomorfonuklearine uždegimine infiltracija endotelio, subendoteliniame sluoksnyje, matomas endotelio atsiskuosiavimas. Paveiksluose intarpuose palyginimui yra pavaizduota nepakitusi centrinė vena, HE × 200

4 lentelė. Atmetimo aktyvumo indeksas (AAI)

Kategorija	Kriterijai	Laipsniai
Portinė uždegiminė infiltracija	Mažai kepenų vartų laukų su negausia mmn* infiltracija; kiek išsiplėtę.	1
	Didžioji dauguma kepenų vartų laukų išsiplėtę; juose yra mišri uždegiminė infiltracija (blastai, eozinofilai, neutrofilai).	2
	Smarki didžiosios daugumos kepenų vartų laukų infiltracija blastais, eozinofilais, neutrofilais, išplitusi į periportinę kepenų parenchimą.	3
Tulžies latakų pažeidimas	Mažai pažeistų (vakuolizota citoplazma / intraepiteliniai limfocitai / branduolių hiperchromija) tulžies latakų.	1
	Dauguma tulžies latakų pažeisti.	2
	Visuose tulžies latakuose – degeneraciniai pokyčiai.	3
Endotelitas	Subendotelinė limfocitinė uždegiminė židininė infiltracija pavienėse vartų / kepenų venose.	1
	Subendotelinė limfocitinė uždegiminė infiltracija daugelyje ar visose vartų / kepenų venose.	2
	Subendotelinė limfocitinė uždegiminė infiltracija visose vartų / kepenų venose su perivenuline hepatocitų nekroze.	3

Atmetimo aktyvumo indeksas (AAI) = komponentų suma: /9.

mmn* – monomorfonuklearinė infiltracija (limfocitais/plazminėmis ląstelėmis).

ją, branduolių piknozę (4 pav.) [11–13]. Imunohistocheminė citokeratino 7 reakcija padeda išryškinti tulžies latakus, ypač tada, kai yra labai gausi uždegiminė infiltracija, maskuojanti tulžies latakus (5 pav.) [14, 15].

Venų endotelio pažeidimas – endotelitas

Endotelitas yra vienas būdingiausių transplantato atmetimo požymių, tačiau dažniausiai pasireiškiantis esant vidutinio ir/ar didelio laipsnio atmetimo reakcijai. Silpnai atmetimo reakcijai yra būdingas fragmentuotas/židininis venos endotelio pažeidimas, kurį itin sunku diagnozuoti praktiškai, o stipriai reakcijai yra būdingas endotelio pažeidimas per visą jo perimetrą. Histologiniai endotelito požymiai yra limfocitų prisivertinimas prie endotelio iš venos spindžio pusės, subendotelinė limfocitų infiltracija, endotelio paburkimas, atsluoksniavimas ir/ar endotelio plyšimas (6 pav.). Esant vidutinio/didelio laipsnio atmetimo reakcijai, labiau pažeidžiamas centrinės venos endotelis [16, 17], o nedidelio – vartų venų endotelis [18].

Labai retai matoma arterito požymių, ypač biopatuose [19]. Tokie vartų arterijų pažeidimai kaip endotelio limfocitinė infiltracija ir fibrinoidinė nekrozė yra būdingi didelio laipsnio atmetimo reakcijai. Angiografiniai tyrimai nurodo vidutinį ir smarkų arterijų pažeidimą esant ūminiam atmetimui [20]. Ketvirtoje lentelėje, naudojantis *Banff* schema, apibendrinami nurodyti pokyčiai, jų raiška laipsniais.

Esama kitų papildomų morfologinių pokyčių, kurių raiška gali būti įvairi esant ūminei atmetimo reakcijai [21–23]:

- perivenulinių sričių uždegiminė infiltracija;
- perivenulinė silpna susiliejanči nekrozė;
- skiltelinių hepatocitų apoptozė;
- kanalėlinė cholestazė;
- hepatocitų balioninė degeneracija.

Silpnai atmetimo reakcijai būdinga pavienių izuoliuotų kepenų vartų lankų atmetimo tipo pažeidimas. Tipiškas atmetimo infiltratas yra sudarytas iš blastinių (aktyvintų) limfocitų, smulkių limfocitų, makrofaagų ir kelių neutrofilų, eozinofilų, nors kartais eozinofilai gali vyrauti, panašiai kaip kilus alerginei reakcijai į vaistus. Jei toks eozinofilinis infiltratas matomas praėjus daugiau nei 6 mėnesiams po kepenų

transplantacijos, diferencinės diagnostikos spektras tampa platesnis. Tuomet atmetimo reakcija atskiriama nuo biliarinės obstrukcijos, alerginių reakcijų, grybelinės infekcijos.

Vidutinei atmetimo reakcijai būdingas daugelio kepenų vartų lankų atmetimo tipo pažeidimas ir išplitimas į aplinkinę kepenų parenchimą. Tulžies lankų pažeidimas gali būti skirtingas, tačiau svarbiausia – nėra perivenulinės (centrilobulinės) nekrozės, susijusios su perivenuliniu uždegimu. Dažniausias pažeidimo laipsnis bus 5–7 pagal AAI.

5 lentelė. Ūminio atmetimo morfologinė diferencinė diagnostika

Kepenų ligos	Skiriamosios morfologinės savybės
Ūminis virusinis hepatitas	Retai pasitaiko venulitas Lobulinis uždegimas > portinis uždegimas
Išeminė cholangiopatija	Smarki duktulių reakcija, vartų edema, polimorfoklearinė uždegiminė infiltracija aplink tulžies latakus
Pasikartojantis PBC*	Granulios, granuliozinis cholangitas
Pasikartojantis PSC*	Periduktalinė koncentrinė fibrozė Retai pasitaiko venulitas
Potransplantacinė limfoproliferacinė liga	Pleomorfinis infiltratas su plazmacitoidinėmis ląstelėmis, B ląstelių tipo imunoblastais
CMV* infekcija	Intranukleariniai CMV intarpai Mikroabscesai Epitelioidinės granulios
EBV* infekcija	Kepenų vartų lankuose ir sinusoiduose – gausūs atipiniai limfocitai ir imunoblastai
Sepsis (gramneigiamos bakterijos)	Intrakanalikulinė / intraduktalinė cholestazė
Tulžies latakų obstrukcija	Smarki latakėlių reakcija Kepenų vartų lankų edema (patvirtinimui būtini radiologiniai duomenys)

PBC* – pirminė biliarinė cirozė

PSC* – pirminis sklerozuojantis cholangitas

CMV* infekcija – citomegaloviruso infekcija

EBV* infekcija – *Ebstein-Barr* virusinė infekcija

Smarki atmetimo reakcija yra reta. Ji pasitaiko tik 5% visų transplantacijų. Kepenų vartų laukų uždegimas labai išplinta į kepenų parenchimą. Svarbiausia yra pažeidimas aplink centrinės venas, kurį galima apibūdinti kaip dviejų komponentų derinį – perivenulinio uždegimo ir su juo susijusios nekrozės. Toks pažeidimas skiriasi nuo išeminės kilmės centrilobulinės nekrozės. Be to, labai būdingas smarkus tulžies latakų epitelio pažeidimas ir visiškas epitelio išnykimas, o tai vėliau gali sukelti lėtinį atmetimą.

Ūminio (ląstelinio) atmetimo diferencinė diagnostika

Daugelis kepenų ligų gali priminti tam tikrus ar netgi visus ūminio atmetimo morfologinius pokyčius. Penktoje lentelėje yra nurodytos kepenų ligos ir joms būdingi požymiai, skirtingi nuo ūminio atmetimo reakcijai būdingų pokyčių. Toliau yra plačiau aprašomi pokyčiai, būdingi prezervacijos / reperfuzijos poveikiui, virusinės ar autoimuninės kilmės hepatitui, kepenų arterijos / venos trombozei, pirminei biliarinei kepenų cirozei, pirminiam sklerozuojančiam cholangitui ir toksiniam vaistų poveikiui.

Prezervacijos / reperfuzijos sukelti pokyčiai

Tuo pat po kepenų persodinimo atlikus nulinę biopsiją, dažnai randama pokyčių, būdingų audinio prezervacijos ypatumams bei reperfuzijai, – būtent tokių kepenų parenchimos pažeidimų kaip hepatocitų balioninė degeneracija, acidofiliniai kūnai, neutrofilinių

granulocitų grupės kepenų parenchimoje ir viduląstelinė cholestazė. Šie pokyčiai ryškūs centrilobulinėse srityse, gali išlikti ir esant ūminio ląstelinio atmetimo reakcijai [7, 24].

Histopatologinių pokyčių, būdingų hepatitui (virusinės / autoimuninės kilmės) ir transplantato atmetimo reakcijai, skirtumai

Ūminiam (ląsteliniam) transplantato atmetimui yra būdinga daugumos tulžies latakų uždegiminiai pokyčiai ir/ar perivenulinis uždegimas su hepatocitų nekroze (angl. *dropout*) aplink daugumą centrinių venų.

Hepatitui nebūdinga uždegiminė tulžies latakų reakcija ar vadinamasis centrinis venulitas. Ūminė ląstelinė transplantato atmetimo reakcija turėtų būti diagnozuojama kaip pagrindinė liga tik tada, kai ji yra vidutiniška ar smarki [6, 7]. Reikia prisiminti, kad 90% ligonių ūminis atmetimas kyla pirmąjį mėnesį ir labai retai – vėliau nei po 12 mėnesių persodinus kepenis. Histologiniai pokyčiai, būdingi hepatitui C ir ūminio atmetimo reakcijai, palyginami 6 lentelėje.

Ūminės atmetimo reakcijos diferencinei diagnostikai yra svarbūs kepenų audinio prezervacijos / reperfuzijos, hepatinės arterijos / venos trombozės ir vaistų sukelti pokyčiai.

Hepatinės arterijos / venos trombozė

Po OKT (dažniausiai dėl chirurginės technikos problemų) galimos komplikacijos hepatinės arterijos, vartų venos ir *vena cava* anastomozė srityje. Apskritai

6 lentelė. Histologinių pokyčių, būdingų hepatitui C ir ūminio atmetimo reakcijai, palyginimas

Histologinės savybės	Hepatitis C	Ūminis atmetimas
Kepenų vartų laukų uždegiminė infiltracija	Mononuklearinė infiltracija (limfocitais)	Mišrus infiltratas (limfocitai, makrofagai, blastai, neutrofilai, eozinofilai)
Sandūros hepatitas	Įvairiai	Lengvas
Tulžies latakų pažeidimas	Lengvas	Taip
Tulžies latakų išnykimas	Minimalus/nėra	Ne
Endotelitas	Nėra/lengvas	Taip
Fibrozę	Taip	Ne
Cholestazė	Retai	Dažnai
Riebalinė infiltracija	Taip (makrovezikulinė)	Ne
Apoptozė	Dažnai	Retai

kraujagyslių komplikacijų dažniau pasitaiko atliekant segmentinę kepenų transplantaciją. Hepatinės arterijos trombozė (HAT) pasitaiko iki 8% ligonių. Dažniausi predisponuojantys veiksniai: arterinės anastomozės problemos, anatinės arterijos savybės, per mažas transplantato dydis, CMV infekcija, sutrikusi trombozė. HAT morfologiškai pasireiškia centrilobuline koaguliacine nekroze, apsupta hemoraginės juostos. HAT yra susijusi su kita svarbia komplikacija – išemine tulžies latakų nekroze, pažeidžiančia pirmiausia didžiausius tulžies latakus, o esant ląsteliniam atmetimui dažniausiai pažeidžiami smulkieji tulžies latakai [20, 25].

Pirminei biliarinei kepenų cirozei (PBC), pirmiam sklerozuojančiam cholangitui (PSC) ir transplantato atmetimo reakcijai būdingų histopatologinių pokyčių skirtumai

Histopatologinių pokyčių, būdingų ūminiam ir lėtiniam transplantato atmetimui, PBC ir PSC, skirtumai pagrįsti pirmiausia nevienodu uždegimo pasiskirstymu kepenų vartų laukuose [26]. Kitas svarbus skirtumas yra vadinamojo limfocitinio cholangito ir centrinio venulito požymiai [17]. PBC ir PSC būdinga tai, kad pamažu išsivysto biliarinis pažeidimas, kuris apibūdinamas kepenų vartų laukų išsiplėtimu pirmiausia dėl kanalėlių reakcijos sandūros zonoje (gerai matomos, atlikus CK 7 reakcijas), o tai visai nebūdinga ūminei ar lėtinei transplantato atmetimo reakcijai.

Ūminė ląstelinė transplantato atmetimo reakcija gali pasireikšti perivenuliniu uždegimu, susijusiu su hepatocitų židinine nekroze, kuri išplinta daugumoje centrinių venų zonų (3-ioji acinuso zona, 6 pav.). Pasikartojančios PBC atveju, priešingai, portinis uždegimas dažniausiai yra pasiskirstęs židiniškai, be to, dažniausiai aplink vidutinio dydžio tulžies latakus vyksta granuliozinė reakcija, vadinamasis „žydintis tulžies latakų pažeidimas“. Tai vienas iš biliarinio tipo pažeidimo požymių.

Toksinis vaistų poveikis

Ciklosporino A (CcA) hepatotoksiškumui yra būdinga grįžtamoji centrilobulinė nekroze, hepatocitų ba-

lioninė degeneracija, cholestazė ir židininė hepatoceliulinė skiltelės nekroze [27].

Azatioprinui būdingas kraujagyslių ir/ar sinusoidų endotelinių ląstelių pažeidimas. Dėl to išsiplėčia sinusoidai, vystosi kepenų peliozė, venų okliuzinė liga ir nodulinė regeneracinė hiperplazija (NRH). Šie pokyčiai yra grįžtami [28].

Kortikosteroidų poveikis yra susijęs su NRH [29].

Takrolimuso (FK506) hepatotrofinis efektas gali pasireikšti centrilobuline nekroze ir noduliniais kepenų struktūriniais pokyčiais, tačiau šie duomenys literatūroje yra priešaringi [16, 30].

Dėl sirolimuso (*rapamycin*) poveikio gali išsivystyti kepenų arterijos trombozė [31].

Atsakas į gydymą

Daugeliu atvejų, kai histologinius ūminio atmetimo pokyčius taip pat lydi klinikiniai / biocheminiai transplantato disfunkcijos pokyčiai, yra būtina skirti papildomą imunosupresinę terapiją, o tai dažniausiai lemia proceso išsisklaidymą. Tuomet, kai ląstelinį atmetimą rodo pakartotiniai kepenų biopatai, nors gydoma kortikosteroidais (steroidams rezistentiškas atmetimas), siūloma vartoti takrolimusą (FK506). Nesant atsako į imunosupresinę terapiją, retais atvejais vystosi lėtinio atmetimo reakcija [32].

Histologinio tyrimo metodika

Kepenų transplantato biopatai buvo tiriami naudojant šaldomąją techniką. Ši skubi intraoperacinė kepenų biopsinė medžiaga buvo pristatoma į Valstybinio patologijos centro priėmimo poskyrį nefiksuota. Mėginys buvo dedamas ant kriokasetės, šaldomas ant kriotomo šaldymo stalelio, iki mėginys visiškai užšals, vėliau pjaunamas 5 mikrometrų storio pjūviais. Tyrimui pakako vieno kokybiško pjūvio ant vieno silanizuoto objekcinio stiklelio. Paruošti šaldomieji pjūviai buvo dažomi greitu hematoksilino-eozino dažymo metodu.

Vėliau, kai buvo suformuluota skubi patologijos diagnozė, kepenų transplantato biopatas buvo merkiamas į buferinį 10% formalino tirpalą ir biopatai ruošiami standartine parafinine technika. Mikroskopiniams tyrimams buvo paruošiami 3–4 mikrometrų storio parafininiai pjūviai. Naudojami standartiniai

(privalomi visiems biopstatams) histologiniai ir histocheminiai dažymo metodai: hematoksilino-eozino histologinis metodas; PAS (periodinės rūgšties ir Šifo reagento) reakcija glikogenui išryškinti; imunohistocheminis citokeratino CK7 dažymo metodas (antikūno klonas OV – TL 12/30; skiedimo santykis 1:400; gamintojas DAKO) tulžies latakų epiteliui išryškinti.

Rezultatai

Valstybiniame patologijos centre buvo atlikti trijų ligonių kepenų transplantatų biopsinės medžiagos tyrimai, kuriais vertinta atmetimo reakcija. Buvo diagnozuota nuo mažo iki didelio laipsnio ūminio atmetimo reakcija. Ūminiam kepenų transplantato atmetimui labiausiai būdingi pokyčiai pateikiami 1–6 pav.

Diskusija

Kalbant apie nulinę kepenų biopsiją, patologui svarbiausia nustatyti steatozės laipsnį biopstatu stulpelyje bei įvertinti jos rūšį: mikro- ar makrovezikulinę steatozę. Tai nėra sunkus uždavinys, tačiau dažnai pasitaiko mišri – mikro- ir makrovezikulinė steatozės forma, kai reikia atsizvelgti į vyraujančią. Nulinės biopsijos stulpeliai yra atliekami šaldomąja technika, todėl steatozės vaizdas, įvertinant ir prezervacijos bei reperuzijos pokyčius, gali skirtis nuo įprasto steatozės vaizdo, kai biopstatas yra paruoštas parafinine technika. Būtent tai gali sunkinti iš pažiūros paprasto morfologinio požymio praktinį vertinimą. Donoro kepenyse vyraujanti makrovezikulinė steatozė yra vienas iš svarbių patologinių veiksnių, lemiančių pirminį transplantato nepakankamumą – šią ankstyvą komplikaciją [33, 34]. Būtent dėl to daugelyje transplantologijos centrų rekomenduojama persodinti kepenis, kuriose makrovezikulinė steatozė ne didesnė nei 30–60% [1, 2]. Kiti rizikos veiksniai, lemiantys pirminį transplantato nepakankamumą, yra santykinai mažas transplantato dydis, vyresnis donoro amžius, užsitęsusi šalčio išemija (daugiau nei 12 valandų) [33]. Imunosupresinė terapija esant šiai būklei yra neveiksminga, todėl būtina kepenų ret-

ransplantacija. Jei koagulopatija smarki, kepenų biopsija neatliekama.

Ūminė ląstelinė atmetimo reakcija iki 60–90% įvyksta pirmąjį mėnesį po kepenų transplantacijos. Įdomu tai, kad pirmosios savaitės po kepenų transplantacijos pabaigoje kliniškai ūminis atmetimas diagnozuojamas 20–40% ligonių, o histologiniai pokyčiai protokoliniuose biopstatuose yra matomi 80% ligonių [7]. Ūminio atmetimo reakcijos dažnesnės vaikams ir suaugusiems žmonėms, kuriems diagnozuota įvairios kilmės imunosupresija. Kai kurių tyrimų duomenimis, ūminis transplantato atmetimas dažnesnis moterims ir tiems, kurie serga autoimuninėmis ligomis [6]. Vėliau, praėjus maždaug metams po kepenų transplantacijos, ūminės atmetimo reakcijos tikimybė sumažėja iki 30%, tačiau ji gali atsirasti bet kuriuo metu, jei imunosupresija bus dėl tam tikrų priežasčių sumažinta ar nutraukta. Tuo metu dažnesnės transplantato disfunkcijos priežastys yra autoimuninių ar virusinės kilmės ligų pasikartojimas *de novo*. Pasikartojančiam virusiniam ir autoimuniniam hepatitui taip pat būdinga portinė uždegiminė infiltracija [2, 35], bet uždegimas daugiau apima sandūros vietą, kur jis dažnai yra aktyvus ir gali būti smarki duktulių reakcija [36, 37] (gerai matoma atlikus CK7 reakcijas). Todėl patologui, vertinančiam patologinius kepenų biopstatu pokyčius, labai svarbu žinoti tikslią kepenų transplantacijos datą, kurią būtina nurodyta siuntime, ir pirminę kepenų ligą. Kepenų biopsija yra būtina norint patvirtinti diagnozę, ypač – atskirti ūminę atmetimo reakciją nuo rekurentinio virusinio hepatito ir ūminio ascendentinio cholangito. Ūminei atmetimo reakcijai sumažinti taikoma papildoma imunosupresinė terapija, o rekurentiniam virusiniam hepatitui gydyti imunosupresija turi būti sumažinta. Mažo laipsnio atmetimo reakcija gali rezorbuotis ar visai išnykti savaime, be papildomos imunosupresinės terapijos [38].

Atmetimo reakciją reikia vertinti kompleksiskai – tai gastroenterologų, chirurgų, imunologų ir patologų komandos darbas. Būtent gebėjimas kompleksiskai įvertinti ir interpretuoti tiek klinikinius, tiek morfologinius pokyčių parametrus gali užtikrinti ligonio gyvenimo kokybę po kepenų transplantacijos.

LITERATŪRA

1. Huebscher SG, Portmann BC. Transplantation pathology. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ. Liver Pathology. 4th edn. Churchill Livingstone, 2002; The liver in organ transplantation; Chap 17.
2. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. In: Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver biopsy interpretation. 7th edn. London: W. B. Saunders, 2006; Chap 15.
3. Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD. MacSween's Pathology of the Liver. 5th edn. Churchill Livingstone, 2007; Chap 16.
4. Haga H, Egawa H, Shirase T, Miyagawa A, Sakurai T, Minamiguchi S et al. Periportal edema and necrosis as diagnostic histological features of early humoral rejection in ABO-incompatible liver transplantation. Liver Transpl 2004; 10: 16–27
5. Dousset B, Hubscher SG, Padbury RT, Gunson BK, Buckels JA, Mayer AD et al. Acute liver allograft rejection – is treatment always necessary? Transplantation 1993; 55: 529–534.
6. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. Hepatology 1998; 28: 638–645.
7. Therapondos G, Hayes PC. Is this the end for protocol early posttransplant liver biopsies? Liver Transpl 2002; 8: 1154–1155.
8. Adams DH, Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. J Hepatol 1990; 10: 113–119.
9. International Panel. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. Hepatology 1997; 25: 658–663.
10. Nagral A, Ben Ari Z, Dhillon AP et al. Eosinophils in acute cellular rejection in liver allografts. Liver Transplant Surg 1998; 4: 355–362.
11. Harrison RF, Patsiaoura K, Hubscher SG. Cytokeratin immunostaining for detection of biliary epithelium: its use in counting bile ducts in cases of liver allograft rejection. J Clin Pathol 1994; 47: 303–308.
12. Tadrous PJ, Goldin RD. How many portal tracts are necessary to make a diagnosis of significant bile duct loss (SBDL)? An exercise in evidence based pathology. J Pathol 1997; 181: A11.
13. Ge X, Ericzon BG, Nowak G, Ohrstrom H, Broome U, Sumitran-Holgersson S. Are preformed antibodies to biliary epithelial cells of clinical importance in liver transplantation? Liver Transpl 2003; 9: 1191–1198.
14. Matsumoto Y, McCaughan GW, Painter DM, Bishop GA. Evidence that portal tract microvascular destruction precedes bile duct loss in human liver allograft rejection. Transplantation 1993; 56: 69–75.
15. van Hoek B, Wiesner RH, Krom RA, Ludwig J, Moore SB. Severe ductopenic rejection following liver transplantation: incidence, time of onset, risk factors, treatment, and outcome. Semin Liver Dis 1992; 12: 41–50.
16. Krasinskas AM, Ruchelli ED, Rand EB, Chittams JL, Furth EE. Central venulitis in pediatric liver allografts. Hepatology 2001; 33: 1141–1147.
17. Tsamandas AC, Jain AB, Felekouras ES, Fung JJ, Demetris AJ, Lee RG. Central venulitis in the allograft liver: a clinicopathologic study. Transplantation 1997; 64: 252–257.
18. Hove WR, van Hoek B, Bajema IM, Ringers J, van Krieken JH, Lagaaij EL. Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes. Liver Transpl 2003; 9: 552–556.
19. Neil DA, Hubscher SG. Histologic and biochemical changes during the evolution of chronic rejection of liver allografts. Hepatology 2002; 35: 639–651.
20. Devlin J, Page AC, O'Grady J, Portmann B, Karani J, Williams R. Angiographically determined arteriopathy in liver graft dysfunction and survival. J Hepatol 1993; 18: 68–73.
21. Hassoun Z, Shah V, Lohse CM, Pankratz VS, Petrovic LM. Centrilobular necrosis after orthotopic liver transplantation: association with acute cellular rejection and impact on outcome. Liver Transpl 2004; 10: 480–487.
22. Gomez R, Colina F, Moreno E, Gonzalez I, Loinaz C, Garcia et al. Etiopathogenesis and prognosis of centrilobular necrosis in hepatic grafts. J Hepatol 1994; 21: 441–446.
23. Turlin B, Slapak GL, Hayllar KM, Heaton N, Williams R, Portmann B. Centrilobular necrosis after orthotopic liver transplantation: a longitudinal clinicopathologic study in 71 patients. Liver Transpl Surg 1995; 1: 285–289.
24. Neil DA, Hubscher SG. Are parenchymal changes in early posttransplant biopsies related to preservation-reperfusion injury or rejection? Transplantation 2001; 71: 1566–1572.
25. Bhattacharjya S, Gunson BK, Mirza DF, Mayer DA, Buckels JA, McMaster P et al. Delayed hepatic artery thrombosis in adult orthotopic liver transplantation – a 12 year experience. Transplantation 2001; 71: 1592–1596.
26. Huebscher SG. Recurrent and *de-novo* disease in the liver allograft. Current Opinion in Organ Transplantation 2006; 11: 283–288.
27. Bluhm RE, Rodgers WH, Black DL, Wilkinson GR, Branch R. Cholestasis in transplant patients-what is the role of cyclosporin? Aliment Pharmacol Ther 1992; 6: 207–219.
28. Sterneck M, Wiesner R, Ascher N, Roberts J, Ferrell L, Ludwig J et al. Azathioprine hepatotoxicity after liver transplantation. Hepatology 1991; 14: 806–810.
29. Stromeyer FW, Ishak KG. Nodular transformation (nodular 'regenerative' hyperplasia) of the liver. A clinicopathologic study of 30 cases. Hum Pathol 1981; 12: 60–71.
30. Francavilla A, Barone M, Todo S, Zeng Q, Porter KA, Starzl TE. Augmentation of rat liver regeneration by FK 506 compared with cyclosporine. Lancet 1989; 2: 1248–1249.

31. Conti F, Morelon E, Calmus Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol* 2003; 39: 664–678
32. Dousset B, Conti F, Cherruau B, Louvel A, Soubrane O, Houssin D et al. Is acute rejection deleterious to long-term liver allograft function? *J Hepatol* 1998; 29: 660–668.
33. Neuberger J. Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: S30–S36.
34. Sugawara Y, Makuuchi M, Kaneko J, Saiura A, Imamura H, Kokudo N. Risk factors for acute rejection in living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2003; 17: 347–352.
35. McTaggart RA, Terrault NA, Vardanian AJ, Bostrom A, Feng S. Hepatitis C etiology of the liver disease is strongly associated with early acute rejection following liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10: 975–985.
36. Regev A, Molina E, Moura R. Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation. *Liver Transplantation* 2004; 10: 1233–1239.
37. Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A et al. Recurrent hepatitis C in liver allografts: prospective assessment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 658–669.
38. Hoffmann RM, Gunther C, Diepolder HM, Zachoval R, Eissner HJ, Forst H et al. Hepatitis C virus infection as a possible risk factor for ductopenic rejection (vanishing bile duct syndrome) after liver transplantation. *Transpl Int* 1995; 8: 353–359.
39. Farges O, Nocci KA, Sebah M, Reynes M, Bismuth H. Low incidence of chronic rejection in patients experiencing histological acute rejection without simultaneous impairment in liver function tests. *Transplant Proc* 1995; 27: 1142–1143.
40. Bartlett AS, Ramadas R, Furness S, Gane E, McCall JL. The natural history of acute histologic rejection without biochemical graft dysfunction in orthotopic liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl* 2002; 8: 1147–1153.

Gauta: 2007-01-15

Priimta: 2007-06-28