ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПО ПУНКЦИОННЫМ БИОПТАТАМ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Шкалова Л.В.[1], Можейко Н.П.[2], Ильинский И.М.[2, 3], Мойсюк Я.Г.[2, 3], Цирульникова О.М.[2, 3], Готье С.В.[2, 3]

[1] ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России», Нижний Новгород
[2] ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва
[3] Кафедра трансплантологии и искусственных органов I МГМУ имени И.М. Сеченова, Москва

Проведено гистологическое исследование 80 пункционных биоптатов аллотрансплантированной печени, из которых в 34 подтвержден предполагаемый клинический диагноз острого отторжения. Гистологические изменения в биоптатах при различной степени острого отторжения оценивали по Banff-классификации 1995, 1997 гг. и сопоставляли с данными современной литературы. В статье обсуждается морфологическая значимость градации острого отторжения на раннее и позднее, анализируется изменение тактики лечения пациентов после постановки морфологического диагноза острого отторжения аллотрансплантированной печени.

Ключевые слова: трансплантация печени, острое отторжение, морфология.

THE DIAGNOSIS OF LIVER ALLOGRAFT ACUTE REJECTION IN LIVER BIOPSIES

Shkalova L.V.[1], Mogeiko N.P.[2], Iljinsky I.M.[2, 3], Moysyuk Y.G.[2, 3], Tsirulnikova O.M.[2, 3], Gautier S.V.[2, 3]

[1] Federal State Institution Volga Regional Medical Center of Federal Bio-Medical Agency, Nizhny Novgorod
[2] Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow
[3] Dept of Transplantology and artificials organs of Sechenov First Moscow Medical University, Moscow

We performed histological examination of 80 liver allograft biopsies, the diagnosis of acute rejection was proved in 34 cases. Histological changes in liver biopsies in different grades of acute rejection were estimated according to Banff classification 1995, 1997 and were compared with current literature data. The article deals with the question of morphological value of grading acute rejection on early and late, also we analyze changes in treatment tactics after morphological verification of liver allograft acute rejection.

Key words: liver allograft, acute rejection, morphology.

На сегодняшний день сроки выполнения пункционных биопсий аллотрансплантированной печени (АП) после ортотопической трансплантации не определены [3]. В связи с этим эпизоды острого отторжения АП нередко не диагностируются, могут протекать субклинически, поэтому крайне сложно установить истинное количество перенесенных пациентами острых кризов отторжения [1, 12].

Морфология острого отторжения в пункционных биоптатах АП в настоящее время оценивается согласно общепринятой Banff-классификации 1995, 1997 гг. [11–12]. Однако на современном этапе развития трансплантологии с учетом накопленного опыта и знаний становится очевидным, что проблема острого отторжения АП выходит за рамки критериев 15-летней давности.

Статья поступила в редакцию 3.06.11 г.
***Контакты:** Ильинский Игорь Михайлович, д. м. н., профессор, руководитель отделения клинической патологии ФНЦТИО.*
***Тел.** 89268118455, **e-mail:** iiljinsky@mail.ru*

В публикациях последних лет активно обсуждаются вопросы наибольшей достоверности отдельных морфологических признаков при остром отторжении [5, 16, 17], рассматривается необходимость разделения острого отторжения АП на раннее и позднее [15], изучаются корреляции между индексом активности острого отторжения (RAI) и ответом на стероиды, выживаемостью трансплантата [4, 9].

В связи с этим возрастает роль пункционной биопсии аллотрансплантированной печени в диагностике и определении тактики лечения острого отторжения [6, 7, 15].

Цель нашей работы: морфологическая диагностика острого отторжения АП на основании исследования пункционных биоптатов с использованием световой микроскопии; изучение гистологических изменений при раннем и позднем остром отторжении в АП, анализ изменения тактики лечения пациентов, оперированных в ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» в период с 2004-го по 2010 г., после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено гистологическое исследование 80 пункционных биоптатов АП больных, оперированных в ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» в период с 2004-го по 2010 г. Для трансплантации использовали печень трупных доноров со смертью головного мозга.

В исследованных биоптатах АП острое отторжение встретилось в 34 наблюдениях. Пункционные биопсии были выполнены в сроки от четырех суток до двух лет (в среднем 164,44 ± 29,86 дня) после операции. Среди пациентов исследуемой группы было 13 мужчин и 11 женщин в возрасте от 21 года до 57 лет (средний возраст 44,31 ± 1,69 года). У 16 пациентов биопсии были выполнены один раз, у 7 – два раза, у 1 – четыре раза. Во время эпизодов острого отторжения все пациенты находились на базовой иммуносупрессии прографом или сандиммуном неоралом.

Показанием к проведению пункционной биопсии в 32 наблюдениях послужило развитие дисфункции трансплантата в виде повышения уровня некоторых или всех стандартных показателей: общего билирубина, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, лейкоцитов и эозинофилов. В 2 наблюдениях биопсии были выполнены по протоколу.

Клиническая необходимость в проведении данного вида исследования возникала преимущественно в период от одного до шести месяцев после операции: до одного месяца – 20,6% (n = 7); от одного до трех месяцев – 26,4% (n = 9); от трех до шести месяцев – 26,4% (n = 9), от шести месяцев до одного года – 17,6% (n = 6), от одного года до двух лет – 9% (n = 3).

Материал пункционных биопсий для световой микроскопии обрабатывали стандартными гистологическими методами, включавшими окраску срезов гематоксилином и эозином, трихромом по Массону с анилиновым синим и PAS-реакцию, с последующим изучением на микроскопе Leica DM 5000.

Острое отторжение пересаженной печени оценивали по Banff-классификации 1995, 1997 гг. с выделением трех степеней: легкой, умеренной и тяжелой.

Функцию печени на момент взятия биопсии оценивали по данным клинической лаборатории ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика Шумакова», где определение ферментов осуществлялось с использованием биохимического анализатора HITACHI 912 (Япония) и набора реактивов фирмы Roche (Германия), методами: IFCC (АСТ, АЛТ), Jendrassik Grof (общий билирубин), Enzymatic (холестерин), DGKC (щелочная фосфатаза).

Результаты, представленные в работе, были обработаны с использованием методов вариационной статистики, включающих критерий Стьюдента, при помощи лицензионной программы STATISTICA/W (лиц. серии № 105, владелец НижГМА), программного обеспечения StatEx-2004.2, электронных таблиц Excel с достоверной вероятностью ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Гистологическое исследование

По результатам гистологического исследования, «неопределенное» отторжение (RAI 3 балла) встретилось в двух биоптатах (5,9%), острое отторжение легкой степени (RAI 4–5 баллов) – в 16 (47,2%), острое отторжение умеренной степени (RAI 6–7 баллов) – в 14 (41%) и острое отторжение тяжелой степени (RAI 8–9 баллов) – в двух (5,9%). Из них раннее острое отторжение наблюдалось в 13 биоптатах (38%) в сроки от четырех дней до двух месяцев и восьми дней после операции (в среднем через 30,69 ± 5,19 дня), позднее острое отторжение – в 21 биоптате (68%) в сроки от трех месяцев до двух лет после операции (в среднем через 247,24 ± 38,41 дня).

При раннем остром отторжении портальный воспалительный инфильтрат (рис. 1) состоял из смешанной популяции клеток (лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов) в различных пропорциях. Деструктивные и воспалительные изменения желчных протоков и воспалительные изменения печеночных вен нарастали с тяжестью остро-

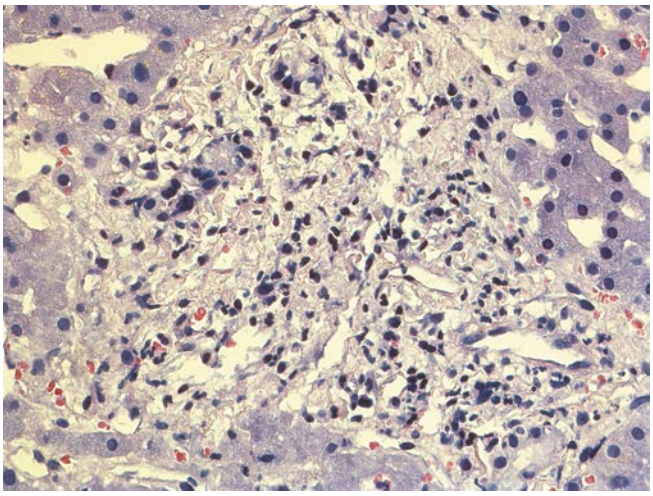

Рис. 1. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени на 28-е сутки после операции. Раннее острое отторжение легкой степени (RAI 5 баллов). Воспалительные и деструктивные изменения желчных протоков, смешанный воспалительный инфильтрат, не выходящий за пределы портального треугольника. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

го отторжения. Воспалительная реакция в мелких желчных протоках была наиболее выражена в биоптатах с холестазами. Эндотелиит печеночных вен портальных трактов варьировал от адгезии лимфоцитов в просветах вен (при легкой/умеренной степени острого отторжения) до субэндотелиальной лимфоидной инфильтрации с повреждением и разрывом эндотелиальной выстилки (при умеренной/тяжелой степени острого отторжения). Центральный перивенулит (рис. 2) с некрозом гепатоцитов перивенулярных зон встречался в отдельных случаях острого отторжения умеренной степени и во всех биоптатах острого отторжения тяжелой степени, часто сочетался с эндотелиитом печеночных вен и с очаговыми некрозами гепатоцитов центров долек. Очаговая и диффузная белковая дистрофия гепатоцитов наблюдалась при легкой/умеренной степени острого отторжения. Баллонная дистрофия гепатоцитов встречалась только в биоптатах с тяжелой степенью острого отторжения. В своем исследовании, независимо от тяжести острого отторжения, мы не наблюдали признаков артериита и фиброза.

При позднем остром отторжении морфологические изменения АП в нашем исследовании не отличались от наблюдаемых изменений при раннем остром отторжении и нарастали с тяжестью патологического процесса (рис. 3, 4).

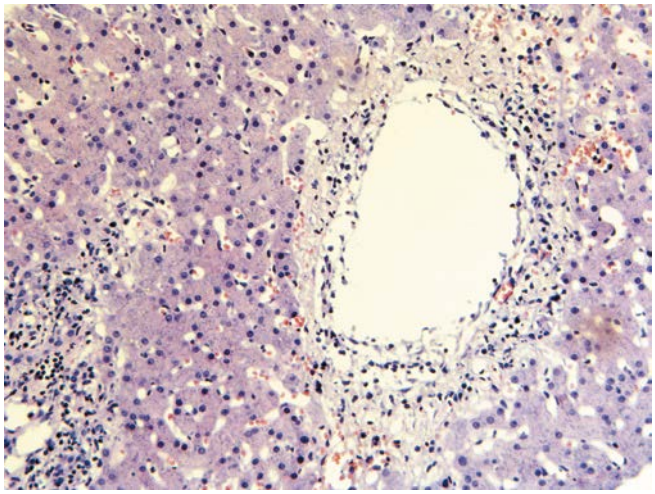

Рис. 2. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени на 18-е сутки после операции. Раннее острое отторжение умеренной степени (RAI 7 баллов). Центральный перивенулит. Окраска гематоксилином и эозином. ×200

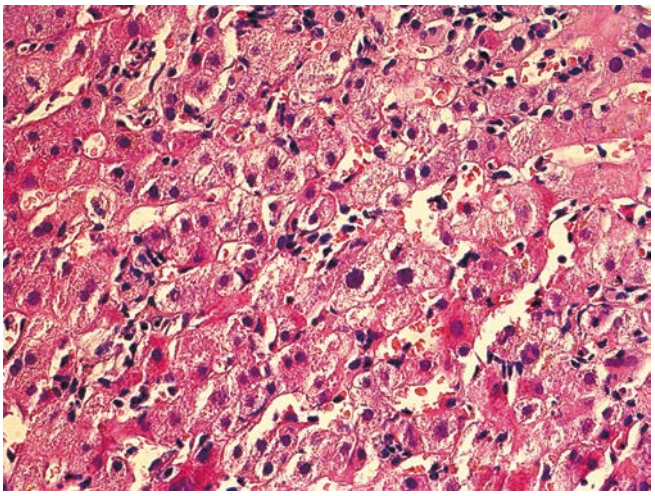

Рис. 3. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени через 6 месяцев после операции. Позднее острое отторжение умеренной степени (RAI 6 баллов). Диффузная белковая дистрофия гепатоцитов, очаговые некрозы гепатоцитов, расширение пространств Диссе с полнокровием синусоидов и скоплением в них лимфоцитов и нейтрофилов. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

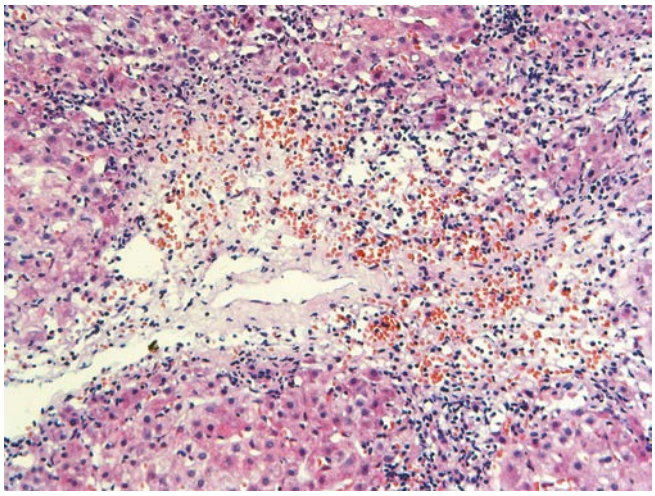

Рис. 4. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени через 1 год 9 месяцев после операции. Позднее острое отторжение тяжелой степени (RAI 8 баллов). Выраженное портальное воспаление диффузного характера в сочетании с кровоизлияниями и очаговыми некрозами гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. ×200

В ходе исследования для статистической оценки из историй болезни пациентов исследуемой группы были выбраны показатели АСТ, АЛТ, общего билирубина, холестерина и щелочной фосфатазы на момент выполнения пункционной биопсии.

Различия между показателями АСТ, АЛТ, общего билирубина, холестерина, щелочной фосфатазы при различной степени острого отторжения во всех группах (легкая/умеренная, легкая/тяжелая и умеренная/тяжелая) и при сравнении их между собой в группах раннего и позднего острого отторжения оказались статистически не достоверными ($p > 0,05$).

2. Изменение тактики лечения у пациентов после морфологического подтверждения острого отторжения аллотрансплантированной печени

Мы проанализировали изменение тактики лечения у пациентов после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения АП (табл.).

В группе пациентов с легкой степенью острого отторжения АП четыре криза отторжения оказались клинико-лабораторно значимыми, что потребовало проведения пульс-терапии, в результате которой был получен положительный терапевтический ответ (тенденция к снижению или полная нормализация клинико-лабораторных показателей функции трансплантата). У 12 пациентов этой группы лабораторные показатели восстановились самостоятельно.

У пациентов с тяжелой степенью острого отторжения АП во всех наблюдениях проводилась пульс-терапия с положительным терапевтическим ответом.

При умеренной степени острого отторжения АП у трех пациентов пульс-терапию не проводили, и клинико-лабораторные показатели восстановились самостоятельно. У восьми пациентов (11 биоптатов) с умеренной степенью острого отторжения пульс-терапию проводили, из них у шести больных (7 биоптатов) был получен положительный терапевтический ответ, а у двух больных (4 биоптата) ответа на антикризовую терапию не было.

У пациентов с положительным ответом на антикризовую терапию ни в одном случае ортотопическая трансплантация печени не выполнялась по поводу цирроза печени в исходе хронического гепатита С.

Пациенты, не ответившие на антикризовую терапию, были оперированы с диагнозом цирроза печени в исходе хронического гепатита С, и на момент биопсии у них решался вопрос о дифференциальной диагностике между ранним острым отторжением и реинфекцией раннего гепатита С в АП. Однако морфологические изменения в пункционных биоптатах по всем критериям соответствовали острому отторжению, что склонило морфолога в пользу этого диагноза.

Таблица

Проведение пульс-терапии после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения аллотрансплантированной печени

	RAI		
	4–5 легкая степень	6–7 умеренная степень	8–9 тяжелая степень
Количество биоптатов	16	14	2
Без лечения пульс-терапией	12	3	0
Пульс-терапия из них: – ответ на пульс-терапию – нет ответа на пульс-терапию	4 4 0	11 7 4	2 2 0

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования у 22 пациентов (34 биоптата) морфологически был подтвержден предполагаемый клинический диагноз острого отторжения АП. Чаще всего диагноз острого отторжения АП был поставлен в период от одного до шести месяцев после операции.

Гистологические изменения в АП при остром отторжении различной степени и в разные сроки после ортотопической трансплантации включали воспалительные и некротические процессы с классической триадой признаков: портальным воспалением, воспалением желчных протоков и вен, что соответствует данным литературы [6, 10–12].

Несмотря на то что некоторые авторы рассматривают центральный перивенулит как признак позднего острого отторжения [2, 13], в нашем исследовании при умеренной и тяжелой степени острого отторжения центральный перивенулит встречался с одинаковой частотой, независимо от времени возникновения острых кризов отторжения в АП.

Многие исследователи описывают прямую зависимость тяжести реакции острого отторжения АП от воспалительного повреждения печеночных венул и прилежащей к ним паренхимы печени [4, 7–9, 12, 14], что совпадает с результатами нашей работы.

В нашем исследовании гистологические изменения в АП при раннем и позднем остром отторжении были однотипными и нарастали с тяжестью острого отторжения.

Полученные нами результаты отличаются от данных Neil and Hübscher [15], описывающих при

позднем остром отторжении мононуклеарный воспалительный инфильтрат (лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги), фиброз, легкое повреждение желчных протоков, печеночных и центральных вен. В биоптатах с острым отторжением, независимо от тяжести и сроков возникновения острых кризов, мы ни разу не наблюдали фиброза.

Возможно, отсутствие различий в морфологической картине раннего и позднего острого отторжения в проведенном нами исследовании связано с небольшим количеством наблюдений, но не исключено, что деление на раннее и позднее острое отторжение по своей сути является клиническим понятием.

Так как именно некро-воспалительные изменения составляют основу острого отторжения АП, то в случаях обнаружения фиброза и/или мононуклеарной воспалительной инфильтрации [15] клинико-морфологически должно исключаться не позднее острое отторжение, а возвратное или *de novo* заболевание в трансплантате печени.

Результаты нашего исследования совпадают с данными литературы о тактике лечения пациентов после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения АП [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пункционная биопсия играет важную роль в постановке диагноза острого отторжения АП и в определении дальнейшей тактики лечения. Чаще всего острое отторжение АП встречается в период от одного до шести месяцев после операции. Морфологическая градация острого отторжения АП по степени тяжести по-прежнему актуальна и определяет дальнейшую тактику лечения пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Готье С.В., Константинов Б.А., Цирульникова О.М.* Трансплантация печени // Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 248 с.
2. *Abraham S.C., Freese D.K., Ishitani M.B. et al.* Significance of central perivenulitis in pediatric liver transplantation // Am. J. Surg. Patol. 2008. V. 32 (10). P. 1479–1488.
3. *Berenguer M., Rayon M., Prieto M. et al.* Are post-transplantation protocol liver biopsies useful in the long-term? // Liver Transpl. 2001. Vol. 23. P. 234–241.
4. *Demetris A.J., Ruppert K., Dvorchik I. et al.* Real-time monitoring of acute liver allograft rejection using the Banff schema // Transplantation. 2002. V. 74 (9). P. 1290–1296.
5. *Dixon L.R., Crawford J.M.* Early histologic changes in fibrosing cholestatic hepatitis C // Liver Transplantation. 2007. V. 13 (2). P. 219–226.
6. *Gornicka B., Ziarkiewicz-Wroblewskaa B., Bogdanskaa M. et al.* Pathomorphological Features of Acute Rejection in Patients After Orthotopic Liver Transplantation: Own Experience // J. Transplantation Proceedings. 2006. V. 38 (1). P. 221 –225.
7. *Gouv A.S., van den Heuvel M.C., van den Berg A.P., Sloff M.J. et al.* Significance of parenchemymal changes of acute cellular rejection in predicting chronic liver graft rejection // Transplantation. 2002. V. 73 (2). P. 243–247.
8. *Hassoun Z., Shah V., Lohse C.M., Pankratz V.S., Petrovic L.M.* Centrilobular necrosis after orthotopic liver transplantation: association with acute cellular rejection and impact on outcome // Liver Transpl. 2004. V. 10 (4). P. 480–487.
9. *Höroldt B.S., Burattin M., Gunson B.K. et al.* Does the Banff rejection activity index predict outcome in patients with early acute cellular rejection following liver transplantation? // Liver transplantation. 2006. V. 12 (7). P. 1144–1151.
10. *Hubscher S.G.* Transplantation pathology // Semin Liver Dis. 2009. V. 29 (1). P. 74–90.
11. *International* Panel. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document // Hepatology. 1997. V. 25. P. 658–663.
12. *International* Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection // Hepatology. 1995. V. 22. P. 648–654.
13. *Krasinskas A.M., Demetris A.J., Poterucha J.J., Abraham S.C.* The prevalence and natural history of untreated isolated central perivenulitis in adult allograft livers // Liver Transpl. 2008. V. 14 (5). P. 625–632.
14. *Lovell M.O., Speeg K.V., Halff G.A., Molina D.K. et al.* Acute hepatic allograft rejection: a comparison of patients with and without centrilobular alterations during first rejection episode // Liver Transpl. 2004. V. 10 (3). P. 369–373.
15. *Neil D.A.H., Hübscher S.G.* Current views on rejection pathology in liver transplantation // Transplant International. 2010. V. 23 (10). P. 971–983.
16. *Regev A., Molina E., Moura R. et al.* Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation // Liver Transplantation. 2004. V. 10 (10). P. 1233–1239.
17. *Stravitz R.T., Shiffman M.L., Sanyal A.J. et al.* Effects of interferon treatment on liver histology and allograft rejection in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation // Liver Transpl. 2004. V. 10. P. 850–858.