

ASPECTE HISTOPATOLOGICE ȘI IMUNOHISTOCHEMICE ÎN CADRUL SINDROMULUI PORTAL HIPERTENSIV ASOCIAT CU HIPERSPLENISM SEVER AUTOIMUN

Vladimir Cazacov¹, Vladimir Hotineanu¹, Raica Marius², Anatol Ciornăi³, Serghei Rusu³
Catedra Chirurgie nr. 2 USMF „Nicolae Testemițanu”¹, Catedra de Histologie USMF „Victor
Babeș”², Catedra Morfopatologie USMF „Nicolae Testemițanu”³

Summary

Histopathologic and immunohistochemical aspects in syndrome of portal hypertension, severe autoimmun hypersplenism

We are presenting a retrospective histopathologic study, that includes 86 patients from Surgical Clinic 1, that have been surgically treated for severe hypersplenism, associated with portal hypertension. At this cases were followed: the determination of the histopathologic diagnosis, the quantification of the necroinflammatory lesions and grading their severity (the Histological Activity Index). A prospective study that is made now, follows the posttherapeutical evolution of the liver lesions from cirrhosis.

Rezumat

Vă prezentăm un studiu histopatologic retrospectiv, care a cuprins un număr de 86 pacienți internați și operați în Clinica 1 Chirurgie pentru hipersplenism sever secundar hipertensiunii portale. La cazurile analizate s-au urmărit: stabilirea diagnosticului histopatologic, cuantificarea leziunilor necroinflamatorii și gradarea severității lor (indecele de activitate hepatică). Un studiu prospectiv în derulare urmărește evoluția postterapeutică a leziunilor hepatice prin ciroză.

Actualitate

Datele din literatura de specialitate vin să sublinieze importanța expresiei imunohistochemice în confirmarea diagnosticului, aprecierea expresiei leziunilor hepatice și implicațiilor prognostice.

Se apreciază că rolul considerabil în patogeneza hipertensiunii portale (HTP), în inițierea, instalearea și persistența sindromului portal hipertensiv este atribuit disfuncției endoteliale vasculare. Modificările hemodinamice determinate de sindromul portal hipertensiv favorizează, prin intermediul statutului hipokinetic și prin inflamația determinată de eliberarea de citokine din endoteliul vascular, apariția modificărilor structurale și funcționale hepato-spleneice(1).

Relația dintre nivelul HTP și gravitatea alterărilor morfologice prezintă o importanță deosebită, privită prin prisma apariției unor complicații severe, uneori chiar letale ale cirozei hepatice. Ghidați de aceste repere am întreprins studiul de față pentru a decela modificările imunohistopatologice și a estima posibilele corelații morfoclinice privind sindromul hipertensiv portal la un lot de pacienți cu ciroză hepatică și hipersplenism sever.

Materiale și metode

Studiul este retrospectiv și analizează datele din baza de date a Clinicii 1 Chirurgie din perioada 2000-2009. S-a studiat buletinul histopatologic al biopitelor hepatice și splenice provenite de la 86 pacienți cirofici operați pentru HTP, hipersplenism portal sever cărora li s-a efectuat devascularizare azigoportală + splenectomie. Selecția cazurilor s-a făcut pe criterii unitare și s-a bazat pe criterii clinice, explorare funcțională hepatică, modificările ultrasonografice și examenul histopatologic efectuat în Laboratorul de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Republican Universitar folosind un protocol standardizat. Evaluarea morfologică a constat din examinarea preparatelor colorate cu metoda hematoxilină-eozină, la care au fost apreciate arhitectura tisulară, prezența și extensia necrozei, fibrozei, leziunile degenerative hepatocitare, și pentru fiecare caz a fost calculat indexul de activitate hepatică. Piesele operatorii au fost prelucrate prin tehnica histopatologică clasică de includere la parafină, urmată de colorațiile uzuale și examene histologice. Materialul utilizat pentru studiul

imunohistochimic a fost reprezentat de 17 biopate examinate în sistem DACO LSAB2/HRH în departamentul histologie, USMF Timișoara, „Victor Babeș”.

Ne-au interesat aspectul imunohistopatologic al modificărilor țesutului hepatic (*tab. 1*) și indexul de activitate hepatică (HAI) calculat pentru fiecare dintre cazurile incluse în studiul morfologic gradat și stadializat pe baza criteriilor Desmet și Rosai (2004), cât și corelarea lor cu severitatea sindromului de hipertensiune portală din cirozele hepatice analizate, indiferent de etiologie.

Tabelul 1

Criteriile de apreciere ale indexului de activitate hepatică modificat

Criteriu	Scor
A. Hepatita de interfață periportală/periseptală (necroză tip picemeal)	
Absentă	0
Ușoară (focală, puține arii portale)	1
Ușoară/Moderată (focală, multe arii portale)	2
Moderată (continuă, în jurul a <50% a tracturilor sau septurilor)	3
Severă (continuă în jurul a >50 a tracturilor sau septurilor)	4
B. Necroza confluentă	
Absentă	0
Necroză confluentă focală	1
Necroze în unele arii din zona 3	2
Necroză în arii numeroase în zona 3	3
Necroză în zona 3 + punți porto-centrale ocazionale	4
Necroză în zona 3 + punți porto-centrale multiple	5
Necroză panacinară sau multiacinară	6
C. Necroză focală litică, apoptoză și inflamație focală	
Absent	0
Un focus sau mai puțin la obiectiv x10	1
Unul-patru focusuri la obiectiv x10	2
Cinci-zece focusuri la obiectiv x10	3
Peste 10 focusuri la obiectiv x10	4
D. Inflamația portală	
Absentă	0
Ușoară, unele arii portale	1
Moderată, unele sau toate ariile portale	2
Moderată/severă, toate ariile portale	3
Severă, toate ariile portale	4

Notă: scorul maxim care poate fi obținut prin cumularea informațiilor incluse în tabel este de 18.

Rezultate și discuții

Cercetările privind definirea profilului etiologic a cirozei hepatice indică o netă predominanță a etiologiei virale (82,7%) urmată de hepatite autoimune (4,2%) și criptogene (3,1%). Analiza profilului etiologic al cirozei indică predominanța etiologiei virale B (55,8%) și asocierii duble B+D (28,7%); B+C (5,9%) sau triple (B+C+D – 1,87%) urmată de etiologia virală C (15,7%).

Din punct de vedere al examenului histopatologic, bazat pe criteriile microscopice evaluarea morfologică și scorificarea biopatelelor hepatice a relevat :

- CH incompletă (25 cazuri) care au încadrat expansiunea fibrozei din spațiile porto cu punți de fibroză porto-portale și porto-centrale delimitate de noduli ;
- CH completă (61 cazuri) – noduli de regenerare cu fibroză în jur și activitate necroinflamatorie intensă.

În CH incompletă, am constatat lărgirea și deformarea semnificativă a spațiilor porte, ocupate de un infiltrat inflamator mononuclear abundent, care se extinde în zonele 1 și 2 acinară.

Aceste infiltrate au fost însoțite la toate cazurile de fibroză cu extensie variabilă, cu tendința de a forma punți între spațiile porte. La toate aceste cazuri am remarcat prezența de necroze focale, zonale și chiar regionale mai ales ale hepatocitelor din zona 1 acinară, caracterizate prin ștergerea limitelor dintre celulele învecinate. Zonele de necroză au fost mai palid colorate cu eozină și a permis recunoașterea lor facilă. Din acest motiv, toate cazurile cu CH incompletă au avut scorul HAI cuprins între 10 și 13, ceea ce semnifică un grad crescut de activitate necro-inflamatorie.

La pacienții cu CH completă, aspectele microscopice au fost similare, dar cu grade diferite de activitate. Toate cele cazuri investigate microscopic au prezentat scor HAI cuprins între 14 și 17. Diferențele au fost generate de punctajul acordat componentei necrotico-inflamatorii, pentru că fibroza a fost prezentă și foarte bine reprezentată la toate cazurile.

Arhitectura tisulară hepatică a fost profund modificată, cu lateralizarea și hiperplazia componentelor spațiului port, asociată sau nu cu hiperplazie de ducte biliare. Diagnosticul anatomo-patologic precizat intraoperator și confirmat ulterior la parafină a evidențiat prezența CH macronodulare în 41 cazuri, micronodulare în -23 și micromacronodulare – în 22 cazuri.

Pe probele de biopsie hepatică am analizat și gradul necroza portală și periportală, inflamația (portală și lobulară) și fibroza. Leziunea caracteristică, nodulul cirogen, a fost identificată la toate cazurile, având dimensiuni variabile (dependent și de incidența secțiunii histologice), de la hepatocite dispuse sub formă de grupuri mici sechestrate în spațiul limitrof vaselor sanguine, până la noduli de dimensiuni mari, care ocupă întregul câmp microscopic la obiectiv mic (*fig. 1a*). La mărirea cu obiectiv mijlociu, se remarcă faptul că nodulii sunt relativ bine delimitați unii de alții prin trabeculi de țesut conjunctiv format din fibre colagene goase, printre care se găsesc numeroase elemente inflamatorii de tip limfocitar (*fig. 1b*). La periferia dar uneori și spre zona centrală a nodulului se observă numeroase hepatocite cu citoplasmă acidofilă, omogenă, dispuse printre hepatocite cu citoplasma palid granulară (*fig. 1c*). La majoritatea cazurilor am observat ca predominantă hepatocite balonizate, rotunde, care maschează spațiile sinusoide și prezintă citoplasma cu granule fine acidofile (*fig. 1d*).

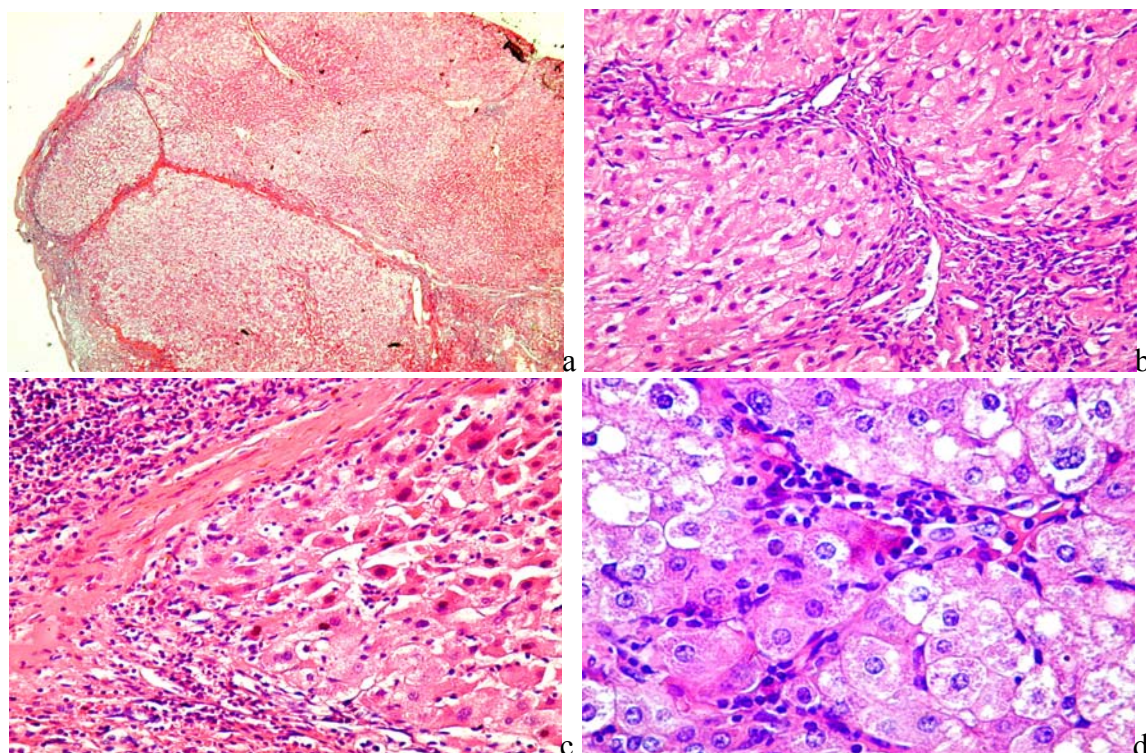


Fig. 1. Noduli cirogeni (on.lupă)(a), Noduli cirogeni despărțiți prin septuri inflamator-fibroase (x100, b). Nodul citogen cu numeroase hepatocite „în sticlă” mată”, cu citoplasma omogen acidofilă (x100, c). Detaliu cu hepatocite cu degenerescență clară și tulbure, asociate cu infiltrat inflamator și necroze focale (x400, c).

Fibroza și infiltratul inflamator predominant limfocitar au fost identificate constant la cazurile cu ciroză, dar cantitativ și ca densitate au fost variabile de la un caz la altul. Acest aspect se reflectă și în scorurile diferite obținute la calcularea HAI. Odată cu creșterea scorului HAI se remarcă acumularea de limfocite dispuse în bandă mai ales la periferia nodulilor cirogeni (fig.2c), la care se asociază trabecule foarte fine de collagen care se dispun prin hepatocitele de neoformație (fig.2d). În vecinătatea ariilor de infiltrat inflamator cu densitate celulară mare se constată prezența de hepatocite cu grade avansate de degenerescență, care se regăsesc mai ales la nivelul citoplasmei, foarte palid colorată sau chiar cromofobă (fig.2e). În ariile în care infiltratul inflamator a avut densitate foarte mare, a fost compus aproape exclusiv din limfocite, am observat arii întinse de necroză, caracterizate prin mase acidofile, în care nu se mai disting limitele dintre hepatocite și nici nucleii acestora (fig.2f).

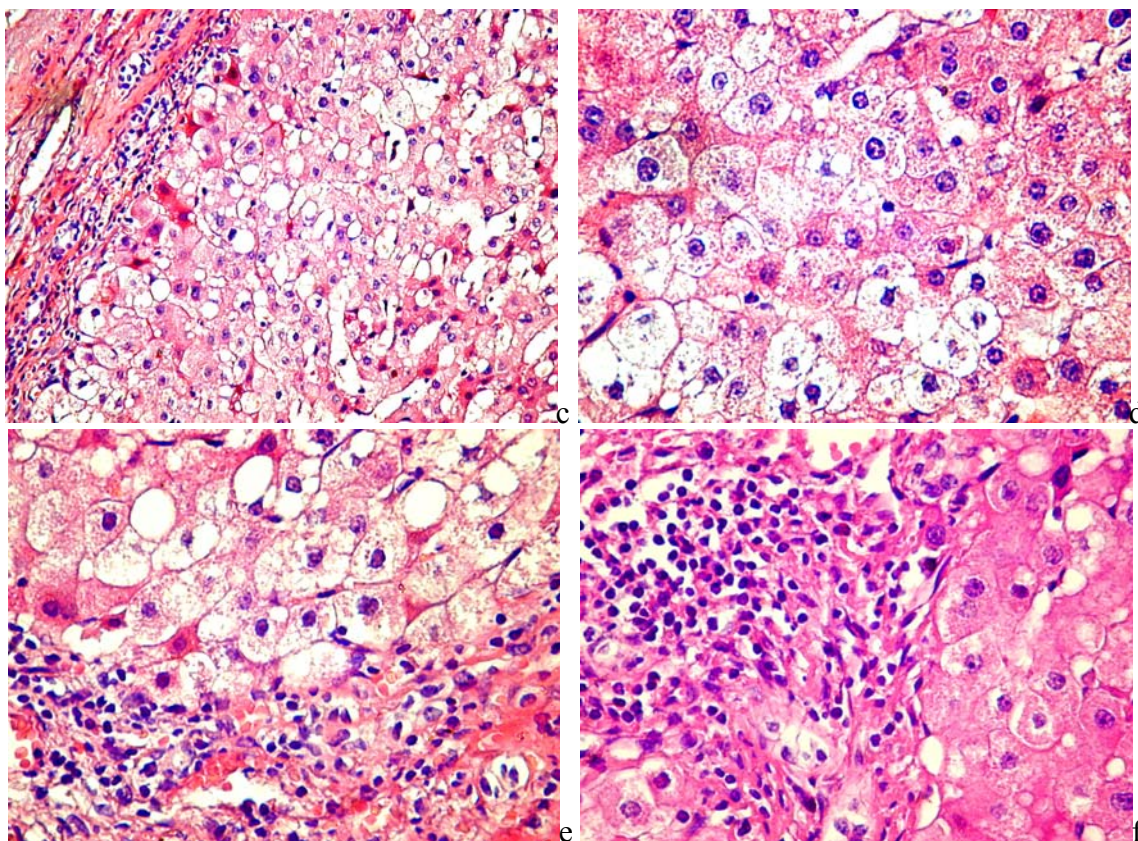


Fig.2. Periferia nodulului cirogen, conținând focal celule intens acidofile (x100, c). Detaliu cu celule apoptotice (x400, d). Numeroase hepatocite cu degenerescență vacuolară și infiltrat inflamator moderat, cu densitatea redusă (x400, e). Hepatocite cu acidofilie omogenă, asociate cu infiltrat inflamator cu densitate mare (x400, f).

Studiul imunohistochimic pe cazuistica noastră a analizat transdiferențierea celulelor Ito-Nemoto și a fibrocitelor din spațiul port în celule secretoare de fibre de collagen de tipul miofibroblastului, aspect cu impact deosebit pentru cunoașterea procesului de fibroză hepatică și identificarea unor elemente cu valoare prognostică. Expresia imunohistochimică a vimentinei - marker util pentru identificarea diferențelor de expresie dintre celulele normale și patologice ale ficatului și indicator fidel al reacției inflamatorii și al fibrozei hepatice, - a fost în concordanță cu gradul de activitate hepatică, fiind cu atât mai intensă cu cât HAI a fost mai mare (fig.3a). Intensitatea de expresie în diferitele zone ale acinului hepatic la bolnavii CH incompletă a fost variabilă și heterogenă. La majoritatea cazurilor, reacția pentru vimentină a fost intens pozitivă datorită extensiei mari a leziunilor de fibroză (fig.3b): nodulii de ciroză au fost înconjurați de benzi groase de fibroză, de obicei cu infiltrat inflamator redus; spațiile porte au fost dezorganizate de proliferarea vasculară, a ductelor biliare și benzile groase de fibroblaste intens

pozitive pentru vimentină. Am observat concentrare masivă de celule vimentin pozitive în special perivascular și peribiliar, iar în unele cazuri - grupe mici de hepatocite sechestrate prin benzi de grosime variabilă, cu celule fusiforme intens pozitive pentru vimentină.

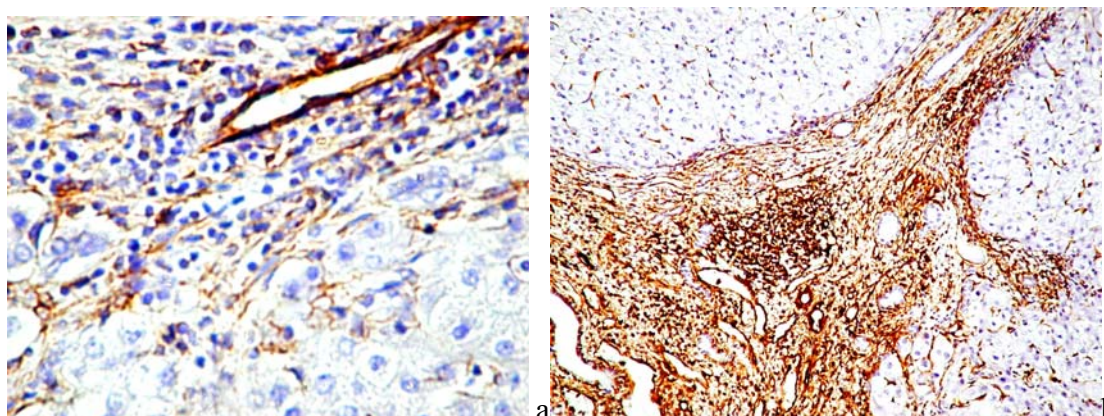


Fig.3. Imunoreacția pozitivă pentru vimentină: a) sunt pozitive vasele sanguine, celulele mezenchimale, rare macrofage și nu se colorează hepatocitele; b) acumulare masivă de celule vimentin pozitive în remanența spațiului port deformat și în extensiile periportale (a, x100).

Rezultatele obținute de noi semnaleză că deși debutul procesului de fibroză are loc la nivel perisinusoidal, un rol deosebit de important îl au componentele portale, fenomenul de fibrozare fiind precedat întotdeauna de prezența unui infiltrat inflamator masiv în care predomină limfocitele. Se pare, de asemenea, că există corelații strânse între prezența dominantă a plasmocitelor în biopiate și creșterea markerilor imunoserologici, a IgG și CIC prezenți în 51 cazuri analizate. Am remarcat că la majoritatea acestor bolnavi proba terapeutică cu prednizolon a fost pozitivă aceasta relatând despre prezența componentului autoimun. Overlap sindromul cu predominarea autoimună a fost documentat pe criterii clinice (preponderența sexului feminin, lipsa de răspuns favorabil la terapia intensivă, eficacitatea corticoterapiei), biologice (mărirea aminotransferazelor, valoarea gamoglobulinelor peste 2,5g/dl, prezența markerilor autoimuni - anticorpilor antinucleari și antimușchi neted), imunologice (mărirea IgG, CIC) și histopatologice (prezența dominantă a infiltrației limfoplasmocitare, a necrozelor porto-portale și porto-centrale) la 34 pacienți.

Urmărind expresia actinei de tip mușchi neted la 20 cazuri cu ciroză hepatică completă am constatat în primul rând modificări dramatice ale arhitecturii parenchimului hepatic. Spațiile porte au fost desființate de procesul inflamator extins asociat cu benzi masive de fibroză, care în majoritatea cazurilor au fost intens pozitive pentru actină (fig.4).

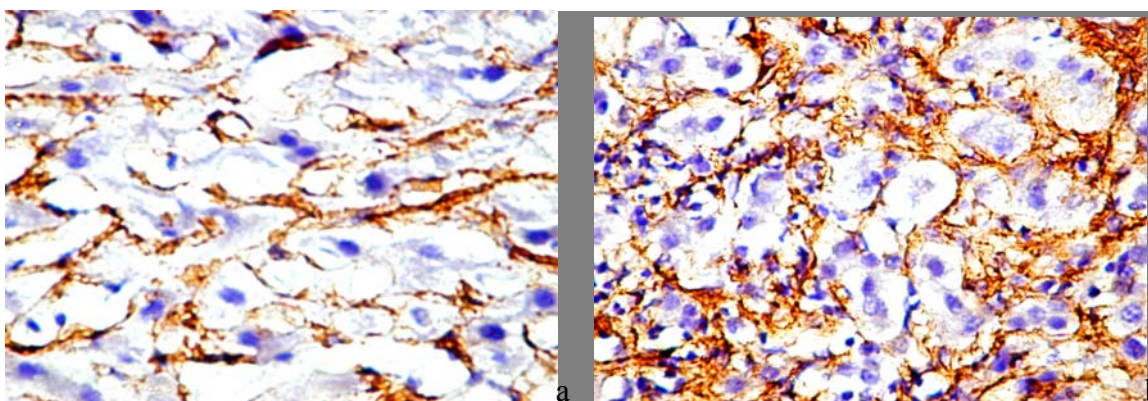


Fig.4. Ciroză hepatică. Imunoreacție pentru actină, x400. Numeroase miofibroblaste între cordoanele de hepatocite (a). Hepatocite sechestrate într-o rețea de celule actin pozitive (b).

Aceste benzi au fost întotdeauna de tip punte între spațiile porte învecinate conectate cu venulele terminale hepatice. Aceste benzi actin pozitive formate predominant din miofibroblaste și fibre de collagen au fost intens ramificate și constant au format prelungiri neregulate care invadează spațiul dintre cordoanele de hepatocite. Aceste structuri au fost însoțite de rețea foarte bine dezvoltată de vase sanguine.

Micronodulii cirogeni au fost complet înconjurați de fascicule intens actin pozitive, progresivă. Acestea aspecte concordă cu datele din literatură care indică că procesele necrotico- inflamatorii ale parenchimului hepatic cirotic realizează sinteza colagenului care se produce atât pe seama creșterii sintezei fibroblastului cât și creșterii numărului celulelor care produc colagen (celulele Ito). Presiunea crescută în sistemul port aduce elementul hemodinamic specific cu răsnet circulator portofug sau hepatopet care este însoțit de complicațiile redutabile generate evolutiv. Pe baza rezultatelor obținute, considerăm că efectuarea imunoreacției pentru *vimentină* și actina de tip mușchi neted trebuie să facă parte integrantă din protocolul de studiu al cirozei hepatice, deoarece aduce informații utile și reprezintă soluția pentru o stadializare cât mai exactă a modificărilor structurale portale și periportale, majoritatea aspectelor descrise nefiind evidente cu alte metode de colorație.

Concluzii

1. Examenul histopatologic a precizat substratul lezional al leziunilor cronice hepatice în cazurile studiate de noi, orientând instituirea unei terapii corecte postoperator.
2. Studiul imunohistochimic al biopitelor hepatice permite evaluarea gradului activității necroinflamatorii și al fibrozei hepatice și diferențierea componentului autoimun care are incidență crescută la pacienții cirofici cu hipersplenism portal sever analizați și pare important ca factor de risc, marker de boală și consecință a acesteia.
3. Datele preliminare obținute indică existența unei corelații semnificative statistic între parametrii imunobiologici și extensia fibrozei hepatice care aduc informații importante fiziopatologice și prognostice.

Bibliografie

1. Andronescu D., Dragomir P., Fierbințeanu C., Negreanu L., “Tratamentul actual al hepatitei cronice virale C”, Noutatea Medicală 3/2005, p.10-14
2. Anuța I., “Aspecte practice ale diagnosticului și tratamentului în hepatitele cronice virale”, Medicina Internă, V.II, nr.3, p.49-52
3. Bozomitu L., Moraru E., Stana B., “Disfuncția endotelială. Sursa modificărilor aptogenetice și a progresiei clinice în hipertensiunea portală”, Revista Română de pediatrie.Vol.LVI, nr.2, a. 2007, p.119-123
4. Ceaușu R., Cîmpean A M., Cazacov V. Overexpression of VEGF and VEGFR in cronic hepatitis and liver cirrhosis. Angiogenesis: prezent and future, p.40. Timișoara, 2009.
5. Desmet et al. – “Classification of chronic hepatitis diagnosis, grading and staging”, Hepatology 1994; 19:1513
6. Dumitrescu Ș., Brătănescu S., Călinoiu A. “Modificări morfopatologice și fiziopatologice la nivelul tractului gastrointestinal în sindromul de hipertensiune”, Noutatea Medicală 4/2005. p.3-9
7. Hotineanu V., Cazacov V., Rusu S. “Aspecte histopatologice și imunoserologice în hipersplenismul portal cirogen”, Constanța, 2009.
8. Luo J.W., Shao J.H., Bai J., Cui L.G., Wang J.R., „Using non-invasive transient elastography for the assessment of hepatic fibrosis”, Zhonghua Gan Bing Za Zhi.-2006.-Vol.14, N5.- p.395-397
9. Mederle O., Ceaușu R., Cazacov V. Early maturation of blood vessels of the spleen in patients with liver cirrhosis, p.48. Angiogenesis: prezent and future. Timișoara, 2009.
10. Myers R.P., de Torres M., Imbert-Bismut F., Ratziu V., Charlotte F., Poynard T., “Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a comparison with prothrombin time, platelet count and the age-platelet index”, Dig Dis Sci. -2003. –Vol.48. p.146-153
11. Sink A. “Modificări histopatologice în hepatita cronică cu virus C asociată cu diabetul zaharat” Revista Medic.RO, 2008, Nr. 35
12. Tănăsescu C., Tănăsescu R. „Hepatitele cronice virale secundar autoimune”, Medicina Internă, 2006, V.1, nr.4. p.11-17