

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ЗУБКО МАРІЯ ДМИТРІВНА



УДК:616.36-006.6-074/-079

**РАК ПЕЧІНКИ: МІКРОСКОПІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ
ДИФЕРЕНЦІЙНІ ТА ПРОГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

14.03.02 – патологічна анатомія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата
медичних наук

Запоріжжя – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **Туманський Валерій Олексійович**, Заслужений діяч науки і техніки України, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини.

Офіційні опоненти:

– доктор медичних наук, професор **Шпонька Ігор Станіславович**, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», декан І медичного факультету, завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини;

– доктор медичних наук, професор **Гичка Сергій Григорович**, Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії №2.

Захист відбудеться « 02 » _____ червня _____ 2016 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 28 » _____ квітня _____ 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



Євсєєв А.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За даними глобальної статистики GLOBOCAN [Ferlay J. et al., 2015] первинний рак печінки (ПРП) в 2012 році зайняв друге місце після раку легенів серед причин онкологічної смертності населення нашої планети. У країнах Європейського союзу захворюваність на гепатоцелюлярний рак (ГЦР) становить 8,29, на холангіоцелюлярний рак (ХЦР) – 0,9–1,3 на 100 000 населення на рік [Eckell F., 2010; Jelic S., 2010]. ГЦР і ХЦР визнаються найбільш агресивними та прогностично несприятливими злоякісними пухлинами [Venook A.P., et al., 2010]. У ранній стадії ГЦР розміром менше 5 см протягом року виживає 50–75% хворих [Forner A. et al., 2010], середні терміни виживання хворих на внутрішньопечінковий ХЦР складають 18–30 місяців [Venook A.P. et al., 2010]. Рівні 5-річної виживаності хворих після R0 хірургічної резекції внутрішньопечінкового ХЦР складають 9–43% [Guglielmi A. et al., 2009], а ГЦР – 37–55,5% [Wong R.J. et al., 2014].

Незважаючи на те, що мікроскопічні особливості ГЦР викладені S.A. Geller et al. (2009), O. Basturk et al. (2010), A.D. Burt et al. (2012), L.L.Ferrel, S. Kakar (2013), найменш вивченим залишається внутрішньопечінковий ХЦР, уперше описаний в 1959 році [Stainer P.E., 1959]. Для діагностики ГЦР і ХЦР застосовують радіологічну візуалізацію пухлини та патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів печінки (ТБП), в якому особливу диференційну актуальність набули імуногістохімічні (ІГХ) дослідження [Туффаха М., Гичка С.Г., Гуски Г., 2013]. При мікроскопії ТБП проблемною є диференційна діагностика певних типів ГЦР, ХЦР та метастатичних пухлин солідно-трабекулярної і тубулярно-залозистої структури, які реєструють в 30 разів частіше, ніж ПРП [Goodman Z.D., 2007; Kasper H.U. et al., 2005]. Поки ще недостатньо визначена діагностична цінність для розпізнавання цих пухлин певних ІГХ маркерів, у зв'язку з неоднорідністю їх експресії та різною чутливістю до них пухлинних клітин [Geller S.A. et al., 2009; Basturk O. et al., 2010; Suriawinata A.A. et al., 2011]. Залишається дискусійним значення рівня експресії α -фетопротейну (AFP) і цитокератинів для диференційної діагностики ПРП. Сьогодні тільки починається розробка прогностичних ІГХ маркерів агресивного перебігу ГЦР та ХЦР: різного рівня експресії пухлинними клітинами маркерів проліферації і апоптозу, молекул міжклітинної адгезії, а також матриксних металопротеїназ та їх інгібіторів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом 2-х держбюджетних науково-дослідних робіт кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету «Морфогенез і рання діагностика онкологічних, серцево-судинних захворювань, фіброзу печінки та підшлункової залози» (№ держреєстрації 0111U005859, 2011–2013 рр.), «Дослідження інвазивно-метастатичних властивостей пухлин і їх раннє прогнозування в біоптатах хворих» (№ держреєстрації 0114U000967, 2014–2016 рр.).

Мета і завдання дослідження. Оптимізувати патоморфологічну діагностику гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку та прогнозування їх перебігу у

хворих шляхом визначення диференційних та прогностичних імуногістохімічних параметрів пухлин в трепанобіоптатах печінки.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Вивчити мікроструктуру ГЦР та експресію його клітинами гепатоцитарних, цитокератинових і інших діагностичних ІГХ маркерів, а також HBsAg і HBeAg.
2. Визначити особливості мікроструктури внутрішньопечінкового ХЦР та експресію його клітинами гепатоцитарних, цитокератинових і муцинозних діагностичних ІГХ маркерів, а також HBsAg і HBeAg.
3. Дослідити в ГЦР і ХЦР печінки рівень експресії маркерів клітинової проліферації (Ki-67) і апоптозу (онкопротеїну p53, каспази-3) та відносну площу, займану в пухлинах імунопозитивними (ІМПЗ) клітинами.
4. Вивчити в ГЦР і ХЦР печінки рівень експресії прогностичних маркерів [матричної металопротеїнази 9 (ММР-9), її тканинного інгібітора 1 (TIMP-1), Е-кадгерину, β -катеніну] та відносну площу, займану в пухлинах ІМПЗ клітинами.
5. Обґрунтувати прогностично несприятливі ІГХ показники ГЦР і ХЦР печінки, які свідчать про схильність до інвазивного росту і збільшення розміру пухлин.
6. Порівняти ІГХ профіль ГЦР, ХЦР печінки та метастазів в печінку злоякісних пухлин солідно-трабекулярної, тубулярної і залозисто-ацинарної структури для їх диференційної діагностики.

Об'єкт дослідження: гепатоцелюлярний та холангіоцелюлярний рак печінки.

Предмет дослідження: диференційно-діагностичні та прогностичні ІГХ маркери гепатоцелюлярного та холангіоцелюлярного раку печінки.

Методи дослідження: гістологічні та ІГХ дослідження трепанобіоптатів пухлин печінки з кількісним фотоцифровим морфометричним (МФМ) аналізом рівня експресії певних ІГХ маркерів та відносної площі імунопозитивних клітин.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі результатів комплексного патоморфологічного дослідження трепанобіоптатів печінки уперше визначено, що внутрішньопечінковий мас-формуєчий ХЦР відрізняється наявністю тубулярного, ацинарного, солідноклітинного і гніздово-клітинного мікроскопічних патернів, локалізованих в рясній фібропластичній стромі. Подальшого розвитку набули сучасні уявлення щодо відповідності певних патернів і виразності фібропластичної стромі ступеню диференціювання внутрішньопечінкового ХЦР. При порівняльному ІГХ-МФМ аналізі уточнені патоморфологічні розбіжності ГЦР та внутрішньопечінкового ХЦР печінки. ІГХ методами визначено значний рівень експресії HBsAg і HBeAg в клітинах ГЦР і ХЦР печінки, що підтверджує важливу роль вірусу гепатиту В у їх розвитку. Уперше на підставі ІГХ-МФМ аналізу визначена роль різної експресії ММР-9, TIMP-1, Е-кадгерину і β -катеніну в інвазивному рості ГЦР та ХЦР печінки. Новими ІГХ даними доповнено наукові уявлення про високу проліферативну активність і знижений рівень апоптозу клітин ГЦР та ХЦР печінки. Уперше за результатами ІГХ-МФМ аналізу проліферативно-

апоптотичних та інвазивно-міграційних маркерів обґрунтовані прогностично несприятливі ІГХ показники ГЦР та ХЦР печінки, які свідчать про схильність до інвазивного розповсюдження клітин та збільшення розмірів пухлин.

Практичне значення отриманих результатів. В дисертації визначені мікроскопічні і ІГХ особливості рідкісного фіброламельярного раку і комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку. Розширені сучасні уявлення щодо відповідності ступеню диференціювання ГЦР певних патернів і варіантів раку: диференційованому ГЦР притаманні солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни; помірнодиференційований ГЦР представлений фіброзним і циротичним варіантами; низькодиференційований і недиференційований ГЦР визначають скірозні, веретенноклітинні, поліморфноклітинні і гігантоклітинні варіанти пухлини. Подальшого розвитку набули мікроскопічні і ІГХ характеристики фіброзно-циротичного і скірозного варіантів ГЦР, які структурно неідентичні ГЦР на тлі цирозу печінки. Визначені диференційні ІГХ особливості скірозних варіантів ГЦР і ХЦР печінки; оптимізовано алгоритм патоморфологічної диференційної діагностики ГЦР і ХЦР печінки та метастазів в печінку злоякісних пухлин солідно-трабекулярної, тубулярної і залозисто-ацинарної мікроструктури.

Результати досліджень з позитивним результатом впроваджені у практичну діагностику Дніпропетровського, Запорізького, Одеського та Львівського обласних патологоанатомічних бюро, лабораторій патоморфології ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України» та ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», а також в науково-дослідному відділі патологічної анатомії Національного інституту рака МОЗ України та в лабораторії патоморфології і цитології ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України». Нові теоретичні і практичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі патологічної анатомії і судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького та Запорізького державного медичного університету, на кафедрах патологічної анатомії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця та Харківського національного медичного університету, на кафедрі патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького державного медичного університету ім. М.І. Пирогова, на кафедрі патологічної та топографічної анатомії НМАПО ім. П.Л. Шупика, на кафедрі патологічної анатомії, гістології і судової медицини Київського медичного університету УАНМ.

Особистий внесок дисертанта. Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим керівником визначені тема і складена програма дослідження. Дисертантом особисто виконано патентно-інформаційний пошук і проаналізовано літературу; самостійно виконані патогістологічні, ІГХ та МФМ дослідження біопсійно-операційного і секційного матеріалу хворих; проведено статистичний аналіз отриманих даних, інтерпретація і систематизація отриманих

результатів. Дисертантом самостійно написані всі розділи дисертації, сформульовані висновки і практичні рекомендації.

Апробація результатів дисертації. Апробація дисертації проведена на засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини; патологічної фізіології; анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; нормальної фізіології; гістології, цитології та ембріології; фармакології та медичної рецептури; мікробіології, вірусології та імунології; онкології; інфекційних хвороб Запорізького державного медичного університету МОЗ України 12.01.2016 р.

Основні положення роботи були обговорені на IX Конгресі патологів України «Актуальні проблеми патології» (Луганськ, 2013), на міжнародних науково-практичних конференціях «Роль та місце медицини у забезпеченні здоров'я людини у сучасному суспільстві» (Одеса, 2014), «Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук» (Одеса, 2014), «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках» (Львів, 2014), «Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку» (Львів, 2015), «Медицина XXI століття: перспективні та пріоритетні напрями наукових досліджень» (Дніпропетровськ, 2015), на Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках» (Київ, 2014), «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць: в тому числі 10 статей – у наукових фахових виданнях України, внесених до міжнародних наукометричних баз (з них 1 стаття – без співавторів), а також 8 тез в матеріалах IX Конгресу патологів України, Всеукраїнських і міжнародних науково-практичних конференцій. Отримано патент України на корисну модель № 99314.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 218 сторінках, складається із вступу, розділу огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, розділу аналізу і обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій і списку з 271 літературних джерел, з яких 47 написані кирилицею і 224 – латиницею. Дисертація ілюстрована 24 таблицями і 89 рисунками, що займають 45 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Патоморфологічними методами досліджені пункційні ТБП у 181 хворого віком 26–83 років, які були розподілені на 3 групи спостережень: I групу склали 55 хворих на ГЦР, II групу – 39 хворих на внутрішньопечінковий мас-формуєчий ХЦР печінки, III групу – 85 хворих на метастатичні пухлини печінки (МПП). У 2-х хворих досліджено комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак печінки. Воротна карцинома Клатскіна і позапечінкова холангіокарцинома не включались в дослідження. Для ІГХ аналізу первинного раку печінки (ПРП) використано 13,80% ТБП з архіву кафедри.

Інфікування пухлинних клітин вірусом гепатиту В вивчені у 87 хворих, серед яких 50 пацієнтів страждали на ГЦР і 37 – хворіли на ХЦР. З урахуванням розміру ПРП, визначеному при ультразвуковому дослідженні перед ТПБ, проведено ІГХ і МФМ аналіз невеликих (розміром до 5 см) пухлин [21 ГЦР і 17 ХЦР] у 38 хворих, а також великих (більше 5 см) пухлин [34 ГЦР і 22 ХЦР] у 56 хворих.

В III групі у 85 хворих вивчено ІГХ профіль МПП: 36 метастазів солідно-клітинної і трабекулярної структури [меланоми – 12, раку молочної залози – 10, нейроендокринної пухлини – 12, раку передміхурової залози – 2], та 49 метастазів тубулярної і залозисто-ацинарної мікроструктури [колоректального раку – 17, протокового раку підшлункової залози (ПРПЗ) – 12, аденокарциноми шлунку – 10, нирковоклітинного раку – 6, раку легень – 4]. ІГХ дослідження 18 МПП проведені спільно з співробітниками Запорізького обласного патологоанатомічного бюро.

Патоморфологічне дослідження ТБП проводилось гістологічними, гістохімічними, ІГХ і МФМ методиками. Стовпчики ТБП фіксували в забуференому 10% формаліні, заливали в парафін та забарвлювали гематоксиліном і еозином, за Ван-Гізоном і Масоном-триколом. ІГХ дослідження виконували в парафінових зрізах ТБП з використанням первинних моноклональних та поліклональних антитіл фірм «Thermo Fisher Scientific Inc.», «ДАКО» (США) та системи детекції ДАКО EnVision+System з діамінобензидином. Використовували наступні антитіла (АТ): HepPar-1 – *Mo a-Hu Hepatocyte* (Clone OCH1E5); AFP – *Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein*; PanCK – *Mo a-Hu PanCytokeratine* (Clone AE1/AE3); *Mo a-Hu Cytokeratine 7* (Clone OV-TL 12/30); *Rb a-Hu Cytokeratine 8* (Clone EP1628Y); *Mo a-Hu Cytokeratine 19* (Clone RSK 108); *Mo a-Hu Cytokeratine 20* (Clone Ks20.8); HBcAg – *Rb a-Hu Primary Hepatitis B Virus Core Antigen*; HBsAg – *Mo a-Hu Primary Hepatitis B Virus Surface Antigen* (Clone 3E7); *Mo a-Hu Ki-67 Antigen* (Clone MIB-1); *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3* (Clone 3CSP03); *Mo a-Hu p53 Protein* (Clone DO-7); *Rb a-Hu MMP-9 (92kDa Collagenase IV)*; *Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2* (Clone 102D1); *Mo a-Hu E-Cadherin* (Clone NCH-38); *Mo a Hu Beta-Catenin* (Clone E247 β -Catenin-1); LCA *Mo a-Hu CD45 Leucocyte Common Antigen* (Clone 2B11+PD7/26); *Mo a-Hu Vimentin* (Clone V9); *Mo a-Hu Melanosome* (Clone HMB45); *Mo a-Hu Tyrosinase* (Clone T311); *Mo a-Hu S100 Protein* (Clone 4c4.9); *Mo a-Hu Synaptophysin* (Clone SY38); *Mo a-Hu CD56* (Clone T199); *Rb a-Hu Estrogen Receptor Alpha* (Clone SP1); *Mo a-Hu Mammaglobin* (Clone 304-1A5); *Mo a-Hu PSA* (Clone ER-PR8); *Mo a-Hu CDX2* (Clone DAK-CKX2); *Mo a-Hu CA 125* (Clone M11), *Mo a-Hu CA 19-9* (Clone C241:5:1:4, «DBS», США); *Rb a-Hu MUC1* (Clone S.854.6); *Mo a-Hu MUC2* (Clone M53); *Mo a-Hu MUC5AC* (Clone 45M1); *Mo a-Hu TTF-1* (Clone 8G7G3/1), *Mo a-Hu CD34* (Clone QBEnd/10), *Rb a-Hu Androgen Receptor* і *Rb a-Hu Chromogranin A*.

Експресію HepPar-1, AFP, CK7, CK20, MMP-9, TIMP-1, β -катенину та Е-кадгерину оцінювали методом фотоцифрової МФМ і градуювали в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ) на 4 рівня: негативна реакція – 0-20 УООЩ;

низький рівень експресії – 21-50 УООЩ; помірний рівень експресії – 51-100 УООЩ; високий рівень експресії – більше 100 УООЩ. Рівень експресії HBcorAg і HBsAg клітинами ГЦР і ХЦР градували на слабкий (наявність 1-33% ІМПЗ клітин), помірний (наявність 34-66% ІМПЗ клітин) і високий (наявність 67-100% ІМПЗ клітин). Експресію HBcorAg і HBsAg в ГЦР і ХЦР градували напівкількісним методом за К. Liu et al. (2005) на слабку «+», помірну «++» і високу «+++» .

Рівень ядерної експресії Ki-67 градували за В. Risberg et al. (2002) на низький – 1 бал (6–25% ІМПЗ клітин), помірний – 2 бали (26–50% ІМПЗ клітин) та 3 бали (51–75% ІМПЗ клітин), високий – 4 бали (76–100% ІМПЗ клітин). Рівень цитоплазматичної (інколи й ядерної) експресії каспази-3 розцінювали як слабкий при наявності 0–33% ІМПЗ клітин, помірний – при наявності 34–66% ІМПЗ клітин і як виразний – при наявності 67–100% ІМПЗ клітин. Низький рівень ядерної експресії p53 реєстрували при наявності <10% ІМПЗ клітин, високий – при наявності 11–29% ІМПЗ клітин, гіперекспресії цього маркера відповідала наявність $\geq 30\%$ ІМПЗ пухлинних клітин [Jian-Liu et. al., 2004].

Відносні площі, займані Her Par-1–, AFP–, CK7–, CK20–, Ki-67–, каспаза-3–, p53– ІМПЗ клітинами в ГЦР і ХЦР, визначали у відсотках методом фотоцифрової МФМ в стандартизованій площі гістологічного зрізу (СПГЗ) цих пухлин. СПГЗ було фотоцифрове зображення гістологічного зрізу пухлини в фотокамері Camedia C5060WZ (Olympus, Японія), зняте на мікроскопі AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Німеччина) при збільшенні $\times 400$. В програмі Image J визначали відносну площу ІМПЗ клітин, яка являла собою відсоткове співвідношення числа пікселів відповідних ІМПЗ клітин до загального числа пікселів у цифровому зображенні ГЦР або ХЦР печінки.

Для диференційної діагностики ПРП і МПП спочатку застосовували ІГХ панель з 4-х АТ (PanCK, LCA, Vimentin, S100), а потім – додаткові ІГХ панелі. Для диференційної діагностики ГЦР та МПП солідно-клітинної і трабекулярної структури визначали експресію HerPar-1, α -FTP, цитокератинових (CK7, CK20), меланоцитарних (HMB45, тирозиназа), нейроендокринних (S100, ChG, Syn, CD56), рецепторно-гормональних (ER, Andr) маркерів, PSA та мамаглобіну. Диференційна діагностика ХЦР та метастазів в печінку ПРПЗ виконана з визначенням експресії HerPar-1, AFP, CK7, CK8, CK19, CK20, MUC1, MUC5AC, CA125, CA19-9. Для диференційної діагностики між ХЦР і МПП тубулярної і залозисто-ацинарної структури використана ІГХ панель HerPar-1, α -FTP, CK7, CK20, CDX2, CA 19-9, CA 125, MUC1, MUC2, MUC5AC, TTF-1.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері у програмі «STATISTICA[®] for Windows 6.0» (StatSoft Inc., ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Обчислювали середнє значення (M), середнє квадратичне відхилення (σ), стандартну помилку репрезентативності середнього значення (m), розраховували 95% довірчий інтервал середнього значення. Проводився також

кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r). Достовірна мінімальна вірогідність відмінностей враховувалася при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Проведені патогістологічні, ІГХ та МФМ дослідження показали, що ГЦР печінки притаманна значна варіабельність мікроструктури. В ГЦР може виявлятися декілька гістоархітектонічних патернів: трабекулярний, солідноклітинний, ацинарний, циротичний; а також світлоклітинний, везикулярноклітинний, веретенноклітинний, гігантоклітинний і поліморфноклітинний варіанти пухлини. Значний мікроскопічний поліморфізм ГЦР у різних його ділянках у одного й того ж хворого зазначає більшість патологів [Hirohashi S. et al., 2000; McKenna B. et al., 2010; Suriawinata A.A. et al., 2011].

При патоморфологічному аналізі трепанобіоптатів пухлин нами визначено, що у G1 високодиференційованому ГЦР виявляються класичні солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни. Помірnodиференційований G2 ГЦР представлений фіброзним і циротичним варіантами пухлини. Низькодиференційований G3 і недиференційований G4 ГЦР визначають скірозні, веретенноклітинні, поліморфноклітинні і гігантоклітинні варіанти пухлин та відсутність трабекулярних і ацинарних структур. Ці результати щодо високодиференційованого ГЦР збігаються з даними N. Shafizadeh, S. Kakar (2011).

Значна структурна варіабельність ГЦР обумовлює необхідність проведення ІГХ досліджень, особливо у випадках, коли в біоптат не попадають типові патерни цієї пухлини. Виконані ІГХ дослідження довели, що для ГЦР характерним є імунофенотип HerPar 1+ | AFP+ | CK7+/- | CK8+ | CK19+/- | CK20+/- | CA125- | CA19-9+/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-. Встановлено, що у 92,45% хворих в клітинах ГЦР виявляється цитоплазматична, гранулярна експресія HerPar-1: високий рівень експресії – у 54,72% пацієнтів, помірний рівень експресії – у 22,64% хворих, низький рівень експресії – у 15,09% пацієнтів. Це відповідає даним K. Kitisin et al. (2007), A. Lugli et al. (2004), які виявляли позитивну експресію HerPar-1 в ГЦР у 80–90% хворих. Нами визначена неоднорідність вогнищового розподілу HerPar-1-позитивних клітин в ГЦР. За даними фотоцифрової МФМ встановлено, що середня площа HerPar-1 позитивних клітин в ГЦР становить $49,35 \pm 25,45\%$ СПГЗ раку. Деякі дослідники вважають достатньою для діагностики ГЦР виявлення помірної або високої експресії HerPar-1 не менш ніж у 10% клітин [Shiran M.S. et al., 2006].

Проведені ІГХ дослідження показали, що у 81,13% хворих в клітинах ГЦР печінки визначається цитоплазматична і ядерна експресія AFP: високий рівень експресії AFP має місце у 37,74% хворих, помірний – у 26,42% пацієнтів, низький – у 16,97% пацієнтів. AFP ІМПЗ клітини в ГЦР займають $37,25 \pm 15,47\%$ СПГЗ пухлини. Експресія AFP вважається характерною рисою злоякісних гепатоцитарних пухлин, однак її рівень в ГЦР коливається від високого [Туффаха М. та інші, 2013] до низького [Kakar S. et al., 2007]. Виконаний кореляційний аналіз показав, що в

ГЦР спостерігається прямий слабкий зв'язок між рівнем експресії пухлинними клітинами AFP і HerPar-1 (коефіцієнт Пірсона $r = +0,25$).

Встановлено, що експресія СК7 в ГЦР була негативною у 62,26% пацієнтів та позитивною і вогнищевою у 37,74% хворих. Площа, займана СК7-позитивними клітинами, становила всього 21,08±5,19% СПГЗ ГЦР. Вогнищева експресія СК20 в ГЦР виявлена у 30,13% хворих, СК20 ІМПЗ клітини займали 29,35±17,31% СПГЗ гепатоцелюлярного раку. На СК7, СК20 і СК19 позитивні властивості ГЦР також вказують А. Durnez et al. (2006). М. Shibuya et al. (2011) виявили експресію СК7 в 75,00% ГЦР, СК19 – в 22,10% ГЦР, за даними L.L. Ferrel (2013) СК7- і СК19-позитивним є тільки низькодиференційований, скірозний і фіброламельярний ГЦР. Кореляційний аналіз показав, що між рівнем експресії в ГЦР AFP і СК7, AFP і СК20 спостерігається пряма середньої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = +0,5$), а між рівнем експресії HerPar-1 і СК7, HerPar-1 і СК20 спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +1$). Встановлено, що в клітинах ГЦР відсутня експресія ЕМА (MUC1), муцину MUC5AC, транскрипційного фактору CDX2 і онкопротеїна CA125. В ендотелії судин і синусоїдів виявляється експресія CD31 і CD34, яка визначає наявність та контури атипичних синусоїдів в солідноклітинному патерні ГЦР. За іншими даними, частота виявлення CD34+ синусоїдів в ГЦР становить від 100% [Coston W.M. et al., 2008] до 42,6% [Karabork A. et al., 2010].

ІГХ аналіз фіброламельярного раку продемонстрував наявність в його великих клітинах цитоплазматичної гранулярної експресії HerPar-1 високого рівня, експресії СК7 і СК20, апікально-поверхневої експресії ЕМА (MUC1) та відсутності експресії AFP. За даними М. Torbenson (2012) великі клітини фіброламельярного раку одночасно мають гепатоцелюлярне, біліарне і нейроендокринне диференціювання; тому вони HerPar-1-позитивні і AFP-негативні, а також позитивні до СК 7, 8 і 18 та інколи – до СК 19 [Ward S.C. et al, 2010; Abdul-Al H.M. et al, 2010].

Результати ІГХ дослідження комбінованого гепато-холангіоцелюлярного раку свідчать про те, що він розвивається зі стовбурових клітин, а також з клітин-попередниць гепатоцитів і холангіоцитів. Тому в солідноклітинному і трабекулярному патернах цієї пухлини виявляються HerPar-1+, AFP+ та СК20+ клітини з гепатоцитоподібним диференціюванням, а в дуктулоподібному патерні – визначаються СК7+ і СК19+ клітини з холангіоцито-біліарним диференціюванням.

Встановлено, що мас-формуєчий ХЦР печінки характеризується наявністю трьох основних мікроскопічних патернів (тубулярного, ацинарного та солідноклітинного), а також значною десмопластичною строюю. Це відповідає сучасним уявленням про те, що внутрішньопечінковий ХЦР асоційований з α -SMA+ стромальними клітинами і фібробластами, які генерують десмопластичну строю [Suriawinata A.A. et al., 2011; Cardinale V. et al., 2013]. Визначено, що в тубулярному патерні ХЦР розташовані або гілкуваті дуктулярні структури з вузькими просвітами, або тубулярні структури з наявними просвітами, вистеленими кубоїдальним та

сплощеним епітелієм. В залозисто-ацинарному патерні ХЦР визначаються криброзні та папілярні утворення, вистелені багаторядним або двох-однорядним стовчастим, високопризматичним і циліндричним епітелієм. Солідно-клітинний патерн ХЦР являє собою поширені ділянки тісно прилеглих кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних клітин з гіперхромними ядрами, вогнищеві скупчення яких також утворюють гніздно-клітинний патерн пухлини. Ці результати відповідають даним J-Y. Liao et al. (2014), S. Rizvi, G.J. Gores (2013), M. Komuta et al. (2012).

Визначено, що високодиференційований G2 ХЦР містить переважно тубулярні структури, у помірнодиференційованому G2 ХЦР серед вузьких прошарків строми визначаються залозисто-ацинарні структури, вистелені 1–2-рядним пухлинним епітелієм без його інвазії в фібропластичну строму пухлини. У низькодиференційованому G3 ХЦР зближені між собою залозисто-ацинарні структури вистелені багаторядним поліморфним пухлинним епітелієм з мембранно-цитоплазматичною експресією муцинів MUC1 і MUC5AC, який утворює мікропапілярні і криброзні структури та місцями проникає в фібропластичну строму, з наявністю в ній поодиноких муцин-продукуючих клітин або дрібних вогнищ муциноподібного ослизнення. У низькодиференційованому ХЦР також визначаються солідно-клітинні, гніздово-клітинні та скірозні ділянки з поодинокими дуктулоподібними структурами, в пухлинних клітинах має місце експресія СА 19-9.

ІГХ дослідження довели, що для внутрішньопечінкового ХЦР характерним є імунотип HerPar 1– | AFP+/- | СК7+ | СК8+/- | СК19+ | СК20+/- | СА125+ | СА19-9+ | CDX2+/- | MUC1+ | MUC5AC+. В клітинах ХЦР відсутня експресія HerPar-1, однак у 47,22% хворих в клітинах ХЦР визначається цитоплазматична і ядерна експресія AFP, нижча за рівнем і площею ІМПЗ клітин, ніж в ГЦР печінки. S.A. Geller et al. (2009) також описують 10% AFP-позитивних ХЦР печінки. Нами визначено, що в цитоплазмі клітин ХЦР печінки у 97,22% хворих визначається експресія СК7, СК7-позитивні клітини займають в ХЦР практично в 2 рази більшу площу, ніж в ГЦР. Експресія СК20 клітинами ХЦР має місце у 45,29% хворих. Виявлений поліморфізм експресії AFP і СК свідчить про те, що при розвитку ГЦР та ХЦР зі стовбурових клітин або з клітин-попередниць, в них з'являється різна «домішка» пухлинних клітин з гепатоцитоподібним і холангіоцитоподібним диференціюванням.

За даними ІГХ аналізу в пухлинних клітинах ГЦР (у 100% хворих) і ХЦР (у 72,97% хворих) визначається дифузно-гранулярна цитоплазматична та ядерна експресія HBsAg. В цитоплазмі клітин ГЦР (у 82,00% хворих) і ХЦР (у 43,25% хворих) виявляється різної інтенсивності експресія HBsAg. Аналогічні данні отримали W.K. Cai et al. (2011), H.B. El-Serag et al. (2009), які вважають, що віруси гепатиту В і С є одними з етіологічних факторів ГЦР та ХЦР печінки.

Результати ІГХ досліджень показали, що ГЦР і ХЦР характеризуються високою проліферативною активністю, гіперекспресією ядерного білка p53 та

низьким рівнем апоптозу. Помірний та високий рівень ядерної експресії Ki-67 зляжисними клітинами визначається у 89,09% хворих в ГЦР і у 74,44% хворих в ХЦР печінки, Ki-67-позитивні клітини займають відповідно $57,18 \pm 15,92\%$ і $54,21 \pm 22,18\%$ СПГЗ цих пухлин. Гіперекспресія і висока ядерна експресія p53 в зляжисних клітинах виявляється у 83,64% хворих в ГЦР і у 61,54% хворих в ХЦР на тлі низької експресії каспази-3 в пухлинних клітинах у 47,28% хворих в ГЦР і у 48,72% хворих в ХЦР. Високий рівень експресії каспази-3 визначається в ГЦР у 27,27% хворих і в ХЦР у 28,2% хворих. Каспаза-3 ІМПЗ клітини займають $49,22 \pm 19,76\%$ СПГЗ ГЦР і $45,74 \pm 20,15\%$ СПГЗ ХЦР печінки. J. Koskinas et al. (2005) також показали, що в ГЦР експресія Ki-67 вище, ніж у прилеглий тканині печінки. За даними X. Wang Zhang et al. (2000) експресія Ki-67 має місце в 96,70%, а p53 – в 53,30% клітин ХЦР. X.U. Peng et al. (2011), W.U. Ying–Ying et al. (2014) знижену експресію каспази-3 знайшли в низькодиференційованому ХЦР з метастазами.

ІГХ дослідженнями визначено, що у 92,73% хворих в клітинах ГЦР і у 89,74% хворих в клітинах ХЦР виявляється цитоплазматична експресія MMP-9, при цьому MMP-9-імунопозитивні клітини займають $59,33 \pm 22,57\%$ СПГЗ ГЦР і $52,71 \pm 20,86\%$ СПГЗ ХЦР печінки. Враховуючи фізіологічні функції MMP, експресію цих ферментів асоціюють з інвазивним ростом пухлинних клітин, з їх проникненням в судини та з метастазуванням ГЦР [Ip Y.C. et al., 2005; Gao Z.H. et al., 2006] і ХЦР [Kim H.J. et al., 2005; Yi-Yin Jan et al., 2004]. Частота позитивної експресії MMP-9 в ХЦР, виявлена іншими дослідниками, варіює від 73% [Yi-Yin Jan et al., 2004] до 95% [Kim H.J. et al., 2005]. K. Itatsu et al. (2008) виявили MMP-9 позитивну ІГХ реакцію в ХЦР у 47,5% хворих. Отримані нами результати свідчать про те, що високій інвазивності пухлинних клітин також сприяє низький рівень цитоплазматичної експресії TIMP-1, виявлений у 80% хворих в ГЦР та у 74,36% хворих в ХЦР. TIMP-1 ІМПЗ клітини займають меншу площу ($21,94 \pm 6,27\%$ СПГЗ ГЦР і $33,05 \pm 13,85\%$ СПГЗ ХЦР печінки) ніж MMP-9 ІМПЗ клітини в цих пухлинах. В обох типах раку між високим рівнем експресії пухлинними клітинами MMP-9 і низьким рівнем експресії TIMP-1 визначається зворотній сильний зв'язок [коефіцієнт Пірсона $r = -0,67$ (ГЦР) і $r = -0,85$ (ХЦР)], що підтверджує їх високий інвазивний потенціал.

Доведено, що ГЦР і ХЦР печінки характеризуються статистично достовірною втратою експресії клітинами E-кадгерину і зростанням аномальної ядерної та цитоплазматичної експресії β -катеніну. При ІГХ та МФМ аналізі встановлено, що у 36,36% хворих експресія E-кадгерину в ГЦР не визначається. Імунопозитивні клітини з мембранною або мембранно-цитоплазматичною експресією E-кадгерину займають $42,25 \pm 15,12\%$ СПГЗ ГЦР у 63,64% хворих і $35,13 \pm 15,69\%$ СПГЗ ХЦР у 100% хворих. Jiang Chen et al. (2014) також спостерігали знижену експресію E-кадгерину у 20-60% низькодиференційованого ГЦР. При паралельному ІГХ та МФМ аналізі у 94,55% хворих на ГЦР і у 100% хворих на ХЦР печінки в пухлинних клітинах виявлена мембранно-цитоплазматична та ядерна експресія β -катеніну.

β -катенін-позитивні клітини займають $62,39 \pm 20,41\%$ СПГЗ ГЦР і $55,83 \pm 19,67\%$ СПГЗ ХЦР печінки. За даними J. Settakorn et al. (2005) цитоплазматична експресія Е-кадгерину і β -катеніну має місце в 100% ХЦР, при цьому мембранна експресія Е-кадгерину визначалась в 37,80% пухлин, β -катеніну – в 41,94% ХЦР, а в 16,13% випадків спостерігалась ядерна експресія β -катеніну. Мембранно-цитоплазматичну та ядерну експресію β -катеніну в 78% ГЦР також виявили Liem Thanh Tien et al. (2005). Нами встановлено, що у ГЦР і ХЦР між низьким рівнем експресії пухлинними клітинами Е-кадгерину і високим рівнем експресії β -катеніну визначається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = -0,78$ і $r = -0,99$ відповідно). За даними Jiang Chen et al. (2014) і Peifeng Li et al. (2014) аномальна цитоплазматична та ядерна експресія β -катеніну виявляється в 17–40% ГЦР, вона є незалежним фактором поганого прогнозу і зростання інвазивності пухлини.

При ІГХ та МФМ дослідженні площ, займаних p53-, каспаза-3-, Ki-67-, ММР-9-, ТІМР-1-, Е-кадгерин- і β -катенін-позитивними клітинами в пухлинах різного розміру, встановлено, що збільшення розмірів ГЦР і ХЦР супроводжується зростанням рівня проліферації пухлинних клітин, гіперекспресією ядерного онкопротеїну p53 з блокуванням апоптозу ракових клітин, втратою ними міжклітинних адгезивних зв'язків і зростанням експресії ММР-9, що в сукупності сприяє швидкому інвазивному росту цих пухлин у печінці. У великому ГЦР розміром більше 5-ти см, в порівнянні з дрібним (менше 5-ти см) ГЦР, визначається статистично достовірно в 1,4 рази вища площа, займана Ki-67-позитивними клітинами, і майже в 2 рази вища площа p53-позитивних клітин, а площі, займані каспаза-3-позитивними клітинами, в ГЦР різного розміру статистично достовірно не відрізняються. При збільшенні розмірів ГЦР в ньому створюються умови для інвазивного розповсюдження пухлинних клітин, про що свідчить зростання в 1,6 разів у великому ГЦР площі клітин з експресією ММР-9 на тлі незмінної площі клітин з експресією її інгібітора ТІМР-1. В ХЦР печінки більше 5-ти см, в порівнянні з дрібним (менше 5-ти см) ХЦР, виявляється статистично достовірно в 1,4 рази вища проліферативна активність пухлинних клітин та зменшений їх апоптоз (ядерна експресія p53 зростає в 1,8 раз, а експресія каспази-3 зростає статистично не достовірно). В ХЦР розміром більше 5-ти см площа Е-кадгерин ІМПЗ клітин статистично достовірно в 2,25 рази менша, ніж в ХЦР діаметром до 5-ти см, а площа β -катенін-позитивних клітин статистично достовірно майже в 1,7 разів вища, ніж в ХЦР діаметром менше 5-ти см. Одночасно ракові клітини ХЦР отримують сприятливі умови для інвазивного розповсюдження, про що свідчить статистично достовірне зростання (в 1,3 рази) експресії ними ММР-9 на тлі незмінного рівня експресії її тканинного інгібітора ТІМР-1.

Встановлено, що типові мікроскопічні патерни ГЦР і ХЦР повною мірою не завжди попадають в пункційний ТПБ печінки з обмеженим обсягом пухлинної

тканини, тому без ІГХ досліджень неможливо диференціювати солідно-клітинний або фіброзно-циротичний варіант ГЦР та ХЦР, а також метастази в печінку зляжисних пухлин аналогічної мікроструктури. Доведено, що надійними диференційними ІГХ маркерами ГЦР (в тому числі – і фіброзно-циротичного ГЦР) є цитоплазматична гранулярна експресія HerPar-1, а також відсутність експресії муцинів. Встановлено, що в диференційній діагностиці ГЦР та ХЦР не завжди надійною є експресія AFP, яка визначається в 81,13% ГЦР і в 47,22% ХЦР, що також підтверджують S.A. Geller, L.M. Petrovic (2009), P.B. Іщенко (2012). Не завжди інформативним є також варіабельний цитокератиновий профіль цих пухлин, тому що експресія CK7 виявляється в ХЦР у 97,22% хворих і в ГЦР у 37,74% хворих; експресія CK20 визначається в ГЦР у 30,13% хворих і в ХЦР у 45,29% хворих. Не знайшли однозначного рішення цього питання також інші дослідники: A. Durnez et al. (2006) встановили, що близько 28% ГЦР, які походять з прогеніторних клітин печінки, містять CK19+ і CK7+ клітини біліарного типу. В той же час С.А. Гусарев (2006) і P.B. Іщенко (2012) вважають, що типовим для ХЦР є профіль (CK7+/CK19+/CK20+), а для ГЦР (CK8+/CK18+).

Встановлено, що ХЦР, метастази в печінку тубулярної і залозисто-ацинарної аденокарциноми шлунка, колоректального раку та ПРПЗ мають однакову мікроструктуру і подібний варіабельний рівень експресії клітинами цитокератинів, CDX2, CA19-9, CA125, MUC1, MUC2, MUC5AC. В ХЦР і в клітинах таких метастазів відсутня експресія TTF-1 і HerPar-1; певне диференційне значення має відсутність експресії CK7 в метастазах колоректального раку і її наявність в метастазах аденокарциноми шлунка. До такого висновку дійшли і інші патологи [Ferrel L.L., 2013; Higashi M. et al., 2012; Miller R.T., 2011; Basturk O. et al., 2010; та інші] Тому диференційний діагноз ХЦР та метастазів цих пухлин в ТБП можливий або при патоморфологічному дослідженні паралельного трепанобіоптату пухлини печінки та підшлункової залози, або з урахуванням даних гастроскопії і колоноскопії; комп'ютерної томографії шлунка, підшлункової залози і товстої кишки. Визначено, що в печінкових метастазах меланоми відсутня експресія цитокератинів, HerPar-1 і FTP, але виявляється експресія S-100, CD56, HMB45 і тирозинази; у клітинах метастазів нейроендокринних пухлин виявляється експресія хромограніна, синаптофізіна і CD56 (рідко також S-100), в них відсутня експресія цитокератинів 7 і 20, гепатоцитарних і меланоцитарних маркерів. Аналогічні ІГХ ознаки метастазів перелічених пухлин відмічають також L.L. Ferrel (2013), M. Туффаха, С.Г. Гичка, Г. Гуски (2013), O. Basturk et al. (2010). Результати ІГХ досліджень показали, що метастази в печінку раку молочної залози відрізняються експресією CK7, рецепторів естрогенів, маммаглобіна та відсутністю експресії CK20, гепатоцитарних, меланоцитарних та нейроендокринних маркерів, що підтверджують також L.L. Ferrel (2013), I. Strumfa et al. (2012), R.T. Miller (2011). Метастази ацинарного раку передміхурової залози в печінці відрізняються

експресією рецепторів андрогенів і PSA, в них відсутня експресія CK7 і 20, гепатоцитарних, меланоцитарних та нейроендокринних маркерів. Це співпадає з даними L.L. Ferrel (2013), O. Basturk et al. (2010), B.A. Centeno (2006), які пропонують додатково досліджувати експресію простатичної кислій фосфатази (PAP).

В клітинах метастазів у печінку світлоклітинного раку нирки зазвичай не визначається експресії CK7 і CK20, на що також вказує R.T. Miller (2011). Однак за даними інших патологів [Ferrel L.L., 2013; Туффаха М., Гичка С.Г., Гуски Г., 2013; Burt A.D. et al., 2012] для діагностики таких метастазів необхідно застосовувати маркери нирковоклітинної карциноми (RCC) і транскрипційний фактор PAX-2, а також враховувати дані комп'ютерної томографії щодо наявності пухлини нирки. Метастази раку легені в печінку є TTF-1- і CK7- імунопозитивними, в клітинах метастазів відсутня експресія CK20, CDX2 і CA125, що також відмічають J.L. Dennis et al. (2005), O. Basturk et al. (2010), R.T. Miller (2011).

ВИСНОВКИ

Гепатоцелюлярний і холангіоцелюлярний рак печінки є одними з найбільш агресивних пухлин, при яких виживання та тактика лікування хворих залежать від раннього і точного патоморфологічного діагнозу. До теперішнього часу проблемною є диференційна діагностика в трепанобіоптатах печінки ГЦР, ХЦР і метастатичних пухлин, а також раннє патоморфологічне визначення перебігу у хворих первинного раку печінки. У дисертаційному дослідженні вирішується актуальне клініко-патоморфологічне завдання щодо диференційної діагностики в пункційних трепанобіоптатах печінки гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку та імуногістохімічного прогнозування їх агресивного перебігу у хворих.

1. ГЦР печінки характеризується наявністю трабекулярного, солідно-клітинного і ацинарного мікроскопічних патернів та фіброзного, циротичного і скірозного варіантів пухлини, а також гранулярною цитоплазматичною експресією HerPar-1 (у 92,45% хворих), цитоплазматично-ядерною експресією AFP (у 81,13% хворих), значним рівнем експресії HBsAg і HBcAg (у 55,17% і 74,0% хворих, відповідно) та варіабельною експресією CK 8, 7, 19 і 20 пухлинними клітинами. HerPar-1+ і AFP+ клітини займають відповідно $49,35 \pm 25,45\%$ і $37,25 \pm 5,47\%$ СПГЗ раку, між рівнями експресії AFP і HerPar-1 має місце прямий слабкий кореляційний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +0,25$). Типовим імунофенотипом ГЦР є HerPar 1+ | AFP+ | CK7+/- | CK8+ | CK19+/- | CK20+/- | CA125- | CA19-9+/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-.

2. Внутрішньопечінковий ХЦР печінки характеризується наявністю в рясній фібропластичній стромі тубулярного, солідно-клітинного і залозисто-ацинарного мікроскопічних патернів та скірозного варіанту пухлини, експресією CK7 (у 97,22% хворих), AFP (у 47,22% хворих), CK20 (у 45,29% хворих), HBsAg і HBcAg (у 27,73%

і 40,22% хворих, відповідно), відсутністю експресії HerPar-1, а також експресією муцинозних маркерів в залозисто-ацинарному патерні. CK7+, CK20+ і AFP+ клітини займають відповідно $43,55 \pm 9,93\%$, $50,28 \pm 16,35\%$ і $17,25 \pm 9,67\%$ СПГЗ раку. Характерним імунофенотипом ХЦР є CK7+ | CK8+/- | CK19+ | CK20+/- | CA125+ | CA19-9+ | CDX2+/- | MUC1+ | MUC5AC+ | AFP+/- | HerPar 1-.

3. Для ГЦР і внутрішньопечінкового ХЦР характерними є висока проліферативна активність та низький рівень апоптозу пухлинних клітин. Помірний та високий рівень ядерної експресії Ki-67 злюкисними клітинами визначається у 89,09% хворих в ГЦР і у 74,36% хворих в ХЦР печінки, Ki-67-позитивні клітини займають відповідно $57,18 \pm 15,92\%$ і $54,21 \pm 22,18\%$ СПГЗ цих пухлин. Гіперекспресія і висока експресія ядерного білка p53 в пухлинних клітинах виявляється у 83,64% хворих в ГЦР і у 61,54% хворих в ХЦР на тлі низької експресії каспази-3 у 47,28% хворих в ГЦР і у 48,72% хворих в ХЦР.

4. ГЦР і ХЦР печінки відрізняються високим інвазивним потенціалом. У 92,73% хворих на ГЦР і у 89,74% хворих на ХЦР печінки визначається експресія MMP-9 в цитоплазмі злюкисних клітин, які займають більше половини СПГЗ цих пухлин, в той час як TIMP-1-позитивні клітини займають всього $21,94 \pm 6,27\%$ і $33,05 \pm 13,85\%$ СПГЗ цих пухлин (відповідно). В обох типах раку між високим рівнем експресії MMP-9 і низьким рівнем експресії TIMP-1 пухлинними клітинами має місце зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = -0,67$ і $-0,85$, відповідно). ГЦР і ХЦР печінки характеризуються статистично достовірною втратою експресії клітинами E-кадгерину і зростанням аномальної ядерної та цитоплазматичної експресії β -катеніну (у порівнянні з гепатоцитами і біліарним епітелієм печінки).

5. Прогностично несприятливими показниками ГЦР і ХЦР печінки, які свідчать про схильність до інвазивного розповсюдження і збільшення розміру пухлин понад 5 см, є статистично достовірне зростання рівня експресії злюкисними клітинами Ki-67, p53, MMP-9, β -катеніну та площ, займаних в пухлинах Ki-67-, p53-, MMP-9-, β -катенін-імунопозитивними клітинами, на тлі низької експресії пухлинними клітинами каспази-3, TIMP-1, E-кадгерину та невеликої площі в пухлинах відповідних імунопозитивних клітин.

6. На відміну від ГЦР, метастази в печінку злюкисних пухлин солідно-трабекулярної структури характеризуються відсутністю експресії гепатоцитарних маркерів (HerPar-1, AFP) і можуть бути ідентифіковані за своїм ІГХ профілем: метастаз меланоми (S100+ / HMB45+ / тирозиназа+); метастаз нейроендокринної пухлини (S100+ / ChG+ / Syn+ / CD56+); метастаз раку молочної залози (CK7+ / CK20- / ER+ / Mgl+); метастаз раку передміхурової залози (CK7- / CK20- / Andr+ / PSA+).

7. ХЦР печінки і метастази в печінку протокового раку підшлункової залози, аденокарциноми шлунка та колоректального раку тубулярної і залозисто-ацинарної структури мають подібний варіабельний рівень ІГХ експресії цитокератинів, CDX2,

CA19-9, CA125, MUC1, MUC2, MUC5AC. Для їх диференційної діагностики необхідні або патоморфологічні дослідження паралельного трепанобіоптату пухлини печінки та підшлункової залози, або данні гастроскопії і колоноскопії, комп'ютерної томографії шлунка, підшлункової залози і товстої кишки.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

При патоморфологічній діагностиці ПРП і МПП враховується мікроструктура пухлин, їх ІГХ характеристики і дані клініко-інструментального обстеження хворих.

1. На першому етапі визначається мікроструктура, основні патерни і виразність фіброзної стромы пухлини. Застосовується ІГХ панель з 5-ти АТ (PanCK, HepPar-1, LCA, Vimentin, S100) для орієнтовного визначення імунофенотипу пухлини.
2. Ключовими параметрами диференційної діагностики ГЦР і ХЦР є їх типова мікроструктура і ІГХ профіль. Для ГЦР: HepPar-1+ | AFP+ | CK7+/- | CK8+ | CK19+/- | CK20+/- | CA125- | CA19-9+/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-; для ХЦР: CK7+ | CK8+/- | CK19+ | CK20+/- | CA125+ | CA19-9+ | CDX2+/- | MUC1+ | MUC5AC+ | AFP+/- | HepPar 1-, а також рясна фібропластична строма.
3. Для диференційної ІГХ діагностики ГЦР і МПП солідно-клітинної, гніздово-клітинної, трабекулярно-ацинарної, фіброзно-циротичної структури застосовуються гепатоцитарні (HepPar-1, FTP), нейроендокринні (ChG, Syn, CD56,), меланоцитарні (HMB45, тирозиназа, S100), гормональні (ER, Andr) маркери, PSA і мамаглобін.
4. Для диференційної діагностики ХЦР і МПП гніздово-клітинної, дуктулярно-тубулярної, залозисто-ацинарної, фіброзно-циротичної структури визначається ІГХ експресія CK7, CK20, MUC1, MUC2, MUC 5AC, CDX2 і TTF-1.
5. Диференційний діагноз між ХЦР та метастазом в печінку ПРПЗ, рака шлунка або товстої кишки проводиться з урахуванням їх ІГХ характеристики та даних ендоскопічного і комп'ютерно-томографічного обстеження хворих.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Зубко М.Д. Характеристика уровня экспрессии E-кадгерина и β -катенина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени / М.Д. Зубко // Патологія. – 2015. – № 2 (34). – С. 64–70.
2. Туманский В.А. Рак печени: особенности экспрессии антигенов вирусного гепатита В / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Патологія. – 2013. – №3 (29). – С. 33–37. *(Дисертант виконала ІГХ дослідження ТБП та аналіз отриманих результатів).*
3. Туманский В.А. Гепатоцеллюлярная карцинома: особенности микроструктуры и экспрессии HepPar-1, альфа-фетопротейна, цитокератинов 7 и 20 / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Патологія. – 2014. – №1 (30). – С. 45–50. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів).*
4. Tumanskiy V.A. Characteristic of expression levels of HepPar-1, alpha-fetoprotein, cytokeratin 7 and 20 by the cells of cholangiocellular cancer in trephine biopsy of the liver

/ V.A. Tumanskiy, M.D. Zubko // Запорожский медицинский журнал. – 2014. – №5 (86). – С.55–58. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів).*

5. Туманский В.А. Гепатоцеллюлярный рак: иммуногистохимическая характеристика апоптоза и пролиферативной активности клеток / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Морфологія. – 2014. – Т.8. – № 3. – С. 57–60. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження, аналіз отриманих результатів).*

6. Туманский В.А. Характеристика уровня экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Патологія. – 2015. – № 1 (33). – С. 20–25. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів).*

7. Туманский В.А. Иммуногистохимическая характеристика пролиферативной активности и апоптоза клеток в холангиоцеллюлярном раке печени / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2015. – № 1. – С. 58–62. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів).*

8. Туманский В.А. Экспрессия маркеров прогрессирования опухоли в гепато- и холангиоцеллюлярном раке печени разной величины / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – №2 (18). – С. 93–97. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження, аналіз та статистичну обробку результатів).*

9. Туманский В.А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика гепатоцеллюлярного, холангиоцеллюлярного рака и метастазов в печень рака поджелудочной железы в пункционных трепанобиоптатах печени / В.А.Туманский, М.Д. Зубко // Запорожский медицинский журнал. – 2015. – №5 (92). – С. 54–61. *(Дисертант виконала ІГХ дослідження ТБП та аналіз отриманих результатів).*

10. Туманский В.А. Сравнительный анализ иммуногистохимических параметров первичного рака печени и метастазов в печень злокачественных опухолей солидно-трабекулярной, тубулярно-железистой структуры в пункционных трепанобиоптатах / В.А. Туманский, М.Д. Зубко, В.Г. Максименко // Патологія. – 2015. – №3 (35). – С. 53–60. *(Дисертант виконала ІГХ дослідження ТБП і аналіз отриманих результатів).*

11. Пат 99314 Україна, МПК 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / Туманський В.О., Євсєєв А.В., Коваленко І.С., Зубко М.Д. – заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т.; заявл. 29.12.14. ; опубл. 25.05.15, Бюл. №10. *(Дисертант приймала участь у наборі первинного матеріалу та оформленні патенту).*

12. Зубко М.Д. Особенности экспрессии цитокератинов 7 и 20 клетками холангицеллюлярного рака в трапанобиоптатах печени / М.Д. Зубко // Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук: збірник матеріалів

міжнародної науково-практичної конференції (м. Одеса, 21-22 листопада 2014 р.). – Одеса, 2014. – С. 61–63.

13. Зубко М.Д. Особенности экспрессии цитокератинов 7 и 20 клетками гепатоцеллюлярного раке в трапанобиоптатах печени / М.Д. Зубко // Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках : збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Київ, 5–6 грудня 2014 р.). – К., 2014. – С. 40–41.

14. Зубко М.Д. Гистоархитектоника и иммуногистохимические маркеры гепатоцеллюлярной карциномы печени/М.Д. Зубко//Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я: збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Запоріжжя, 5–6 грудня 2015 р.). – Запоріжжя, 2015. – С. 18–19.

15. Зубко М.Д. Индивидуальная вариабельность экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени / М.Д. Зубко // Медицина ХХІ століття: перспективні та пріоритетні напрями наукових досліджень: збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Дніпропетровськ, 24–25 липня 2015 р.). – Дніпропетровськ, 2015. – С. 67–70.

16. Туманський В.О. Імуногістохімічна характеристика апоптотичної і проліферативної активності клітин раку печінки / В.О. Туманський, М.Д. Зубко, Л.М. Туманська // Український медичний альманах. – 2013. – Т. 16, – №3 (додаток). – С.221. *(Дисертант виконала ІГХ дослідження та аналіз отриманих результатів)*.

17. Туманський В.А. Особенности экспрессии HerPar-1 и альфа-фетопротеина в гепатоцеллюлярном раке печени / В.А. Туманский, М.Д. Зубко // Роль та місце медицини у забезпеченні здоров'я людини у сучасному суспільстві: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (м. Одеса, 21-22 листопада 2014 р.). – Одеса. – 2014. – С. 164–165. *(Дисертант виконала ІГХ та МФМ дослідження ТБП)*.

18. Зубко М.Д. Особливості експресії HBcorAg і HBsAg антигенів клітинами гепатоцеллюлярного раку в трепанобиоптатах печінки / М.Д. Зубко , В.А. Туманский // Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках: Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 26–27 грудня 2014 р.). – Львів, 2014. – С. 98–99. *(Дисертант виконала ІГХ дослідження ТБП та аналіз отриманих результатів)*.

19. Зубко М.Д. Порівняльна імуногістохімічна характеристика рівня проліферації та апоптозу в холангіоцеллюлярному та гепатоцеллюлярному раку печінки // М.Д. Зубко, В.О. Туманський // Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку: збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 30–31 січня 2015 р.). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 98–100. *(Дисертант виконала ІГХ і МФМ дослідження та аналіз отриманих результатів)*.

АНОТАЦІЯ

Зубко М.Д. Рак печінки: мікроскопічні і імуногістохімічні диференційні та прогностичні характеристики. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2016.

У дисертації за результатами комплексного патоморфологічного дослідження показано, що ГЦР та ХЦР притаманна значна варіабельність мікроструктури з наявністю декількох гістоархітектонічних патернів. Виявлено, що ГЦР характеризується експресією HerPar-1 і AFP, HBsAg і HBcAg, та варіабельною експресією СК8, СК7, СК19 і СК20. Внутрішньопечінковий ХЦР характеризується експресією СК7, AFP, СК20, HBsAg і HBcAg, відсутністю експресії HerPar-1, а також експресією муцинозних маркерів в залозисто-ацинарному патерні. Показано, що ГЦР і внутрішньопечінковий ХЦР відрізняються високою проліферативною та низькою апоптотичною активністю, а також високим інвазивним потенціалом. ГЦР і ХЦР також характеризуються достовірною втратою експресії клітинами E-кадгерину і зростанням аномальної експресії β-катеніну. Прогностично несприятливими параметрами ГЦР і ХЦР є достовірне зростання рівня експресії клітинами Ki-67, p53, MMP-9 і β-катеніну на тлі низької експресії каспази-3-, TIMP-1 і E-кадгерину.

Визначено, що на відміну від ГЦР, метастази інших злоякісних пухлин солідно-трабекулярної мікроструктури в печінці характеризуються відсутністю експресії гепатоцитарних маркерів і можуть бути ідентифіковані за своїм характерним ІГХ профілем. Диференційний діагноз ХЦР та метастазів в печінку ПРПЗ, аденокарциноми шлунка та колоректального раку здійснюється або при паралельному патоморфологічному дослідженні трепанобіоптату підшлункової залози, або з урахуванням клініко-інструментальних досліджень шлунка, підшлункової залози, товстої кишки.

Ключові слова: гепатоцелюлярний рак, холангіоцелюлярний рак, метастази, морфометрія, імуногістохімія

АННОТАЦИЯ

Зубко М.Д. Рак печени: микроскопические и иммуногистохимические дифференциальные и прогностические характеристики. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия. – Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2016.

В диссертации по результатам комплексного патоморфологического исследования показано, что ГЦР и ХЦР присуща значительная вариабельность микроструктуры с наличием нескольких гистоархитектонических паттернов. Выявлено, что ГЦР характеризуется экспрессией HerPar-1 и AFP, HBsAg и HBcAg,

и вариабельной экспрессией CK8, CK7, CK19 и CK20. Внутривнутрипеченочный ХЦР характеризуется экспрессией CK7, AFP, CK20, HBsAg и HBcAg, отсутствием экспрессии HepPar-1, а также экспрессией муцинозных маркеров в железисто-ацинарном паттерне. Показано, что ГЦР и внутривнутрипеченочный ХЦР отличаются высокой пролиферативной и низкой апоптотической активностью, а также высоким инвазивным потенциалом. ГЦР и ХЦР также характеризуются достоверной потерей экспрессии клетками E-кадгерина и ростом аномальной экспрессии β -катенина. Прогностически неблагоприятными параметрами ГЦР и ХЦР являются достоверный рост уровня экспрессии клетками Ki-67, p53, MMP-9 и β -катенина на фоне низкой экспрессии каспазы-3, TIMP-1 и E-кадгерина.

Определено, что в отличие от ГЦР, метастазы других злокачественных опухолей солидно-трабекулярной микроструктуры в печени характеризуются отсутствием экспрессии гепатоцитарных маркеров и могут быть идентифицированы по своим характерным ИГХ профилям. Дифференциальный диагноз ХЦР и метастазов в печень ПРПЖ, аденокарциномы желудка и колоректального рака осуществляется либо при параллельном патоморфологическом исследовании трепанобиоптата поджелудочной железы, или с учетом клинико-инструментальных исследований желудка, поджелудочной железы, толстой кишки.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярный рак, холангиоцеллюлярный рак, метастазы, морфометрия, иммуногистохимия

SUMMARY

Zubko M.D. The liver cancer: microscopic and immunohistochemical differential and prognostic characteristics. – As manuscript.

Candidate's of Medical Science dissertation in specialty 14.03.02 – pathologic anatomy. – Zaporozhye State Medical University of the Ministry of Health Care of Ukraine, Zaporozhye, 2016.

In the current dissertation based on the results of the pathomorphological, immunohistochemical and morphometrical studies, the vast microstructure variability of HCC and CCC alongside with their several hystoarchitectonic patterns is being demonstrated. HCC is characterized by trabecular, basal cellular and acinar microscopic patterns; fibrous, cirrhotic, scirrhous variants of tumor, the valuable expression level of HepPar-1, AFP, HBsAg and HBcAg, and also the variable expression of CK8, CK7, CK19 and CK20. There is a minor correlation between the tumor cell's expression of AFP and HepPar-1. HepPar-1+ and AFP+ cells occupy correspondingly $49,35 \pm 25,45\%$ and $37,25 \pm 5,47\%$ of the standard HCC shear section. The HCC's typical immunophenotype is HepPar 1+ | AFP+ | CK7+/- | CK8+ | CK19+/- | CK20+/- | CA125- | CA19-9+/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-. Intrahepatic CCC is being characterized by the presence of the tubular, basal cellular and glandular-acinar patterns and the scirrhous variant of the tumor, the expression of CK7, AFP, CK20, HBsAg and HBcAg and the expression of the

mucinous markers in the glandular-acinal pattern. CK7, CK20 and AFP immunopositive cells occupy correspondingly $43,55 \pm 9,93\%$, $50,28 \pm 16,35\%$ and $17,25 \pm 9,67\%$ of the standard CCC shear section. The CCC's typical immunophenotype is CK7+ | CK8+/- | CK19+ | CK20+/- | CA125+ | CA19-9+ | CDX2+/- | MUC1+ | MUC5AC+ | AFP+/- | HepPar-1-.

HCC and intrahepatic CCC are being characterized by means of a high proliferative activity and a minor level of apoptosis. Hyperexpression and high nuclear expression p53 of the tumor cells is being revealed in 83,64% of HCC cases and in 61,54% of CCC cases. On the background of the low caspase-3 expression – in 47,28% of HCC cases and in 48,72% of CCC cases. It is for sure, that both HCC and CCC are being characterized by the high invasive potential. There is the expression of MMP-9 in the cytoplasm being observed in 92,73% cases of HCC and in 89,74% cases of CCC, which occupy more than the half of tumor's standard shear section, while the TIMP-1+ cells occupy only $21,94 \pm 6,27\%$ and $33,05 \pm 13,85\%$ tumor's standard shear section.

There is the strong indirect connection between the high level of cellular expression of MMP-9 and the low level of the TIMP-1 expression in both variant of cancer. Both HCC and CCC are being characterized by statistically significant loss of the cellular expression of E-cadherine alongside with the growth of nuclear and cytoplasmic β -catenin. Prognostic unfavorable parameter of both HCC and CCC is the statistically significant growth of the cellular expression of Ki-65, p53, MMP-9 and β -catenin by immunopositive cells on the background of low expression of caspase-3, TIMP-1, E-cadherine and the overall small area of the corresponding immunopositive cells, which results into invasive growth of tumor and size increase more than 5 cm.

Unlike HCC's ones, the liver metastases from malignant tumors of solid-trabecular microstructure are being described by the absence of HepPar-1, AFP expression and can be identified with the help of unique IHC profile. The differential diagnosis of HCC liver's trepan-biopsy material and liver metastases of duct pancreas carcinoma, gastric adenocarcinoma and collateral carcinoma of tubular and glandular-acinal structure is possible by means of pathomorphological studying the parallel liver's tumor trepan-biopsy material, or taking into account the gastroscopy and colonoscopy data; CT of stomach, pancreas and colon.

Keywords: hepatocellular cancer, cholangiocellular cancer, metastasis, morphometry, immunohistochemistry

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТ	– антитіла
АФР	– α-фетопроतेїн
ГЦР	– гепатоцелюлярний рак
ІГХ	– імуногістохімічне (дослідження)
ІМПЗ	– імунопозитивні (клітини)
ММР	– матриксна металопротеїназа
МПП	– метастатичні пухлини печінки
МФМ	– морфометричні (методики)
НВсAg	– серцевинний антиген вірусу гепатиту В
НВsAg	– поверхневий антиген вірусу гепатиту В
ПРП	– первинний рак печінки
ПРПЗ	– протоковий рак підшлункової залози
СК	– цитокератин
СПГЗ	– стандартизована площа гістологічного зрізу (пухлини)
ТБП	– трепанобіоптат печінки
УООЩ	– умовна одиниця оптичної щільності
ХВГ	– хронічний вірусний гепатит
ХЦР	– холангіоцелюлярний рак

Підписано до друку 26.04.2016 р. Гарнітура Times New Roman.

Папір друкарський. Формат 60×90/16. Умовн. друк. арк. 0,9.

Обл.-вид. арк. 0,9. Друк – ризограф.

Наклад – 100 прим. Зам. № 6846.

Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26