

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

На правах рукопису

ЗУБКО МАРІЯ ДМИТРІВНА

УДК: 616.36-006.6-074/-079

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

14.03.02 – патологічна анатомія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата
медичних наук

Науковий керівник
Туманський Валерій Олексійович
доктор медичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України

Запоріжжя – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНИЙ ТА ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНИЙ РАК ПЕЧІНКИ: ЕПІДЕМІОЛОГІЯ, ПАТОМОРФОЛОГІЯ, ДИФЕРЕНЦІЙНІ І ПРОГНОСТИЧНІ ПАРАМЕТРИ.....	12
1.1. Епідеміологія і особливості перебігу раку печінки.....	13
1.2. Макро- і мікроскопічна характеристика гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки.....	17
1.3. Диференційна імуногістохімічна характеристика гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки.....	27
1.4. Прогностичні патоморфологічні параметри гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки.....	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1. Матеріал дослідження.....	39
2.2. Методи та методика досліджень.....	42
РОЗДІЛ 3. МІКРОСКОПІЧНА І ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОГО РАКУ ПЕЧІНКИ	49
3.1. Мікроскопічна характеристика гепатоцелюлярного раку	49
3.2. Імуногістохімічна характеристика гепатоцелюлярного раку і комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку ..	64
3.3. Диференційна імуногістохімічна характеристика гепатоцелюлярного раку та метастазів в печінку інших пухлин солідноклітинної і трабекулярної мікроструктури	79
РОЗДІЛ 4. МІКРОСКОПІЧНА І ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНОГО РАКУ ПЕЧІНКИ	90
4.1. Гістологічна характеристика холангіоцелюлярного раку печінки	90

4.2. Імуногістохімічна характеристика холангіоцелюлярного раку печінки	101
4.3. Диференційна імуногістохімічна характеристика холангіоцелюлярного раку та метастазів в печінку інших пухлин тубулярної і залозисто-ацинарної мікроструктури.....	108
РОЗДІЛ 5. ПРОГНОСТИЧНІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОГО ТА ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНОГО РАКУ ПЕЧІНКИ.....	121
5.1. Мікроскопічна і імуногістохімічна характеристика проліферативно-апоптотичних процесів в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку печінки.....	121
5.2. Імуногістохімічна характеристика експресії MMP-9, TIMP-1, β-катеніну та E-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки.....	130
5.3. Морфометричний аналіз середньої площі p53-, каспаза-3-, Ki67-, MMP-9-, TIMP-1-, β-катенін-, E-кадгерин – імунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку печінки різного розміру.....	148
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ВИСНОВКИ	157
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	187
	189

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AFP – α -фетопротеїн

Зб. – збільшення

ВООЗ - Всесвітня організація охорони здоров'я

ГЦР – гепатоцелюлярний рак

ІГХ - імуногістохімічний/імуногістохімічне (дослідження)

МФМ– морфометричні (методики)

ММР-9 – матриксна металопротеїназа-9

HBsAg –серцевинний антиген вірусу гепатиту В

HBsAg – поверхневий антиген вірусу гепатиту В

HBV - вірус гепатиту В

HCV – вірус гепатиту С

ПРП – первинний рак печінки

ПРПЗ– протоковий рак підшлункової залози

СПГЗ– стандартизована площа гістологічного зрізу (пухлини)

СК – цитокератин

УЗД – ультразвукове дослідження

УООЩ– умовна одиниця оптичної щільності

ТІМР-1 – тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ-1

ХВГВ – хронічний вірусний гепатит В

ХВГС– хронічний вірусний гепатит С

ХЦР – холангіоцелюлярний рак

ЦП – цироз печінки

КГХР – комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак

ВСТУП

Актуальність теми.

За даними глобальної статистики GLOBOCAN, опублікованій в 2015 році [60], рак печінки (РП) в 2012 році зайняв друге місце серед причин онкологічної смертності населення нашої планети після раку легенів. У країнах Європейського союзу захворюваність гепатоцелюлярним раком (ГЦР) становить 8,29 на 100 000, холангіоцелюлярним раком (ХЦР) - 0,9-1,3 на 100 000 населення на рік [96, 159]. ГЦР і ХЦР визнаються найбільш агресивними та прогностично несприятливими злоякісними пухлинами [250]. У ранній стадії ГЦР розміром менше 5 см протягом року виживає 50-75% хворих, при наявності пухлини розміром більше 5 см виживаність хворих становить 16 місяців, а при наявності судинної інвазії або позапечінкового розповсюдження - 6 місяців [87]. Середні терміни виживання хворих на внутрішньопечінковий ХЦР складають 18-30 місяців [250], більшість хворих помирає протягом року після встановлення діагнозу [235, 250]. Рівні 5-річної виживаності хворих після R0 хірургічної резекції внутрішньопечінкової пухлини складають 9-43% при ХЦР [154] і 37-55,5% при ГЦР [101, 148], а поновлення росту раку після ортотопічної трансплантації печінки відбувається у 35-75% хворих на ХЦР [80] і у 13-27% хворих на ГЦР [177].

Незважаючи на те, що мікроскопічні особливості ГЦР викладені S.A. Geller et al. [123], O. Basturk et al. [53], A.D. Burt et al. [59], L.L.Ferrel, S. Kakar [118], поки ще найменш вивченим залишається внутрішньопечінковий ХЦР, уперше описаний P.E. Stainer в 1959 році [240]. Повноцінного скринінгового методу діагностики ГЦР та ХЦР не розроблено, для їх ранньої діагностики використовують радіологічні методи візуалізації та патоморфологічне дослідження біоптатів печінки, в якому особливу диференційно-діагностичну актуальність набули імуногістохімічні (ІГХ) дослідження [43]. При мікроскопічному дослідженні трепанобіоптату іноді дуже складно відрізнити ГЦР, ХЦР та метастази в печінку раку іншої первинної локалізації, які реєструють в 30 разів частіше, ніж первинні пухлини [127, 162]. Чітка

диференційно-діагностична цінність запропонованих ІГХ маркерів в розпізнаванні ГЦК, ХЦК та метастазів в печінку інших злоякісних пухлин поки ще визначена недостатньо у зв'язку з неоднорідністю їх експресії та різною чутливістю до них пухлинних клітин [53, 123, 244]. Залишається дискусійним питання використання різного рівня експресії α -фетопротеїну (AFP) при диференційній діагностиці ГЦР та ХЦР печінки, а також питання відмінностей цитокератинового профілю цих пухлин.

Недостатньо розроблені для трепанобіоптатів печінки диференційні ІГХ відмінності між солідноклітинними варіантами ГЦР, ХЦР та метастазами іншого рака в печінку, залишаються мало вивченими відмінності між фіброзно-циротичними варіантами ГЦР та ХЦР. Поки відсутня оптимальна ІГХ панель для диференційної діагностики в пункційних трепанобіоптатах печінки ГЦР, ХЦР та метастатичних солідно-трабекулярних і тубулярно-залозистих пухлин невстановленої первинної локалізації. Сьогодні тільки розпочинається розробка прогностичних ІГХ маркерів агресивного перебігу ГЦР та ХЦР: до цього часу недостатньо вивчено значення для перебігу пухлини різного рівня ІГХ експресії пухлинними клітинами маркерів їх проліферації і апоптозу, молекул міжклітинної адгезії E-кадгерину і β -катеніну, а також матриксних металопротеїназ та їх інгібіторів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота 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», 2011-2013рр. (№ державної реєстрації 0111U005859) і «Дослідження інвазивно-метастатичних властивостей пухлин і їх ранне прогнозування в біоптатах хворих», 2014-2016рр. (№ державної реєстрації 0114U000967), в яких дисертантом проводився набір біопсійного матеріалу, його патоморфологічне і морфометричне дослідження та статистична обробка отриманих результатів.

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 гепатоцелюлярного раку та експресію його клітинами гепатоцитарних, цитокератинових і інших діагностичних ІГХ маркерів, а також HbsAg і HbcAg.

2. Визначити особливості мікроструктури внутрішньопечінкового холангіоцелюлярного раку та експресію його клітинами гепатоцитарних, цитокератинових і муцинозних діагностичних ІГХ маркерів, а також HbsAg і HbcAg.

3. Дослідити в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку печінки рівень експресії маркерів проліферації (Ki-67) і апоптозу (онкопротеїну p53, каспази-3) та відносну площу, займану в пухлинах імунопозитивними (ІМПЗ) клітинами.

4. Вивчити в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку печінки рівень експресії прогностичних маркерів [матричної металопротеїнази 9 (ММР-9), її тканинного інгібітора 1 (ТІМР-1), Е-кадгерину, β -катеніну] та відносну площу, займану в пухлинах ІМПЗ клітинами.

5. Обґрунтувати прогностично несприятливі ІГХ показники гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки, які свідчать про схильність до інвазивного росту і збільшення розміру пухлин.

6. Порівняти ІГХ профіль гепатоцелюлярного, холангіоцелюлярного раку 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 холангіоцелюлярний рак 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 холангіоцелюлярного рака.

При порівняльному ІГХ-МФМ аналізі уточнені патоморфологічні розбіжності гепатоцелюлярного та внутрішньопечінкового холангіоцелюлярного раку печінки. ІГХ методами визначено значний рівень експресії HBsAg і HBcAg в клітинах гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки, що підтверджує важливу роль вірусу гепатиту В у їх розвитку.

Уперше на підставі ІГХ-МФМ аналізу визначена роль різної експресії MMP-9, TIMP-1, E-кадгерину і β -катеніну в інвазивному рості гепатоцелюлярного та холангіоцелюлярного раку печінки. Новими ІГХ даними доповнено наукові уявлення про високу проліферативну активність і знижений рівень апоптозу клітин гепатоцелюлярного та холангіоцелюлярного раку печінки.

Уперше за результатами ІГХ-МФМ аналізу проліферативно-апоптогенних та інвазивно-міграційних маркерів обґрунтовані прогностично несприятливі ІГХ показники гепатоцелюлярного та холангіоцелюлярного раку печінки, які свідчать про схильність до інвазивного розповсюдження клітин та збільшення розмірів пухлин.

Практичне значення отриманих результатів. В дисертаційній роботі визначені мікроскопічні і ІГХ особливості рідкісного фіброламельярного раку і комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку. Розширені сучасні уявлення щодо відповідності ступеню диференціювання гепатоцелюлярного раку певних патернів і варіантів раку. Доведено, що диференційованому гепатоцелюлярному раку притаманні солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни; помірнодиференційований гепатоцелюлярний рак 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 гепатоцелюлярного раку, які структурно неідентичні гепатоцелюлярному раку на тлі цирозу печінки. Визначені диференційні ІГХ особливості скірозних варіантів гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки; оптимізовано алгоритм патоморфологічної диференційної діагностики гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки та метастазів в печінку злоякісних пухлин солідно-трабекулярної, тубулярної і залозисто-ацинарної мікроструктури.

Результати проведених досліджень з позитивним результатом впроваджені у практичну діагностику в КУ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро», КУ «Запорізьке обласне патологоанатомічне бюро», КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро», КУ «Львівське обласне патологоанатомічне бюро», у роботу 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 національного 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 Української Асоціації народної медицини.

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 спільному засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини; патологічної фізіології; анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; нормальної фізіології; гістології, цитології та ембріології; мікробіології, вірусології та імунології; онкології; фармакології та медичної рецептури; інфекційних хвороб Запорізького державного

медичного університету МОЗ України 12.01.2016 р.

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

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 ІХ Конгресу патологів України, Всеукраїнських і міжнародних науково-практичних конференцій. Отримано патент України на корисну модель № 99314.

РОЗДІЛ 1

ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНИЙ ТА ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНИЙ РАК ПЕЧІНКИ: ЕПІДЕМІОЛОГІЯ, ПАТОМОРФОЛОГІЯ, ДИФЕРЕНЦІЙНІ І ПРОГНОСТИЧНІ ПАРАМЕТРИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ)

За даними ВООЗ, щорічно у всьому світі реєструється чверть мільйона нових випадків первинних пухлин печінки, що складає 5–11 % всіх інших пухлин. Захворюваність на РП в світі становить 560 тис., а смертність — до 550 тис. випадків на рік [21, 77, 136], за даними глобальної статистики Міжнародного агентства з вивчення раку серед причин онкологічної смертності населення нашої планети РП у 2012 році займав друге місце [60], у 2002-2008 роках - третє 3 місце після раку легенів і раку шлунка [99, 126].

Первинний РП розподіляється на гепатоцелюлярну карциному (або гепатоцелюлярний рак - ГЦР), холангіокарциному та комбіновану гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярну карциному (або комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак – КГХР) [59]. В структурі первинного раку печінки 75% складає ГЦР [250] який виникає з стовбурових/прогеніторних клітин печінки або шляхом малігнізації гепатоцитів [140, 142]. В Міжнародній класифікації пухлин органів травлення ВООЗ [254], на підставі анатомо-топографічного походження з різних жовчних протоків, виділяється внутрішньопечінкова/периферійна холангіокарцинома і позапечінкова холангіокарцинома, в якій розрізняють холангіокарциному воріт печінки (воротну, хиліосну пухлину Клатскіна) та дистальну холангіокарциному з клітин серединної та інтрапанкреатичної частини жовчовивідного протоку. Тобто, холангіокарцинома, яка походить з правих і лівих печінкових протоків в зоні/або біля їх злиття, складає так звану позапечінкову холангіокарциному воріт печінки (пухлину Клатскіна), а

холангіокарцинома, яка виникає із внутрішньопечінкових великих жовчних протоків (із других їх гілок або сегментарних гілок), є перихиліозною внутрішньопечінковою холангіокарциномою. Найменш вивченою залишається внутрішньопечінкова (периферійна) холангіоцелюлярна карцинома - або холангіоцелюлярний рак (ХЦР), описаний в 1959 році по аналогії з ГЦР [240], який може розвиватися з холангіоцитів дрібних внутрішньопечінкових протоків, дистальніше їх другої сегментації [129], а також з печінкових стовбурових клітин, локалізованих в каналцях Герінга, або зі стовбурових/прогеніторних клітин, локалізованих в перибіліарних залозах внутрішньопечінкового та позапечінкового біліарного дерева [198, 224].

Комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак (КГХР) сьогодні розглядається як рідкий (менш ніж 1%) первинний рак печінки зі змішаним гепатоцитарним, холангіоцитарним та проміжним (гепатоцитарно-холангіоцитарним) фенотипом, клітини якого одночасно експресують деякі гепатоцитарні і біліарні імуногістохімічні маркери, а також варіабельний цитокіновий профіль [78, 140].

1.1 Епідеміологія і особливості перебігу гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки.

Гепатоцелюлярний рак займає 5-е місце у світі серед солідних пухлин за поширеністю і 3-є місце за загальною смертністю від онкологічних захворювань [214]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я ГЦР включений в перелік 130 основних причин захворюваності та смертності населення, він займає в п'яте місце в світі серед чоловіків і восьме місце - серед жінок [5, 169]. За статистикою, щороку в світі реєструється понад 600 000 нових випадків ГЦР [211, 263].

ГЦР відрізняє різна його поширеність в певних регіонах світу, яка пов'язується з різною частотою інфікування населення вірусами гепатиту В і

C, а також коінфекції з ВІЛ [141]. На стадії цирозу печінки такі хворі мають найбільший ризик розвитку ГЦР [98]. Епідеміологічні дослідження показали, що ризик розвитку раку печінки у хворих гепатотропною вірусною інфекцією в 20 разів вище, ніж у решти населення [5, 47]. Згідно з Е.Б.Ярошенко і співавт. [47] в 75-80% випадків ГЦР має вірусний генез, причому 50-55% припадає на частку HBV інфекції, а 25-30% - на частку гепатотропної С-вірусної (HCV) інфекції. Канцерогенез при HBV і HCV інфекції має свої особливості. HBV є ДНК-вірусом, який здатний інтегруватися в хромосомну ДНК гепатоцита і викликати точкові мутації, делеції і транслокації різних її локусів, а також підвищувати чутливість ДНК до несприятливих факторів міжклітинного середовища [85]. Можливо також, що вірусна інфекція порушує стабільність генома гепатоцитів [22]. HCV є РНК-вірусом, який не здатний вбудовуватися в геном клітин печінки, тому в якості можливого механізму розвитку пухлини розглядається здатність вірусу гальмувати апоптоз, спрямований на елімінацію гепатоцитів з пошкодженою ДНК [20]. При HBV інфекції пухлина може виникнути не тільки на фоні цирозу (це спостерігається приблизно в 75% випадків), а у хворих на хронічний гепатит В і навіть при неактивному носійстві HBsAg. Можлива взаємодія HBV і HCV у розвитку ГЦР, так як у хворих з коінфекцією HCV і HBV (HBsAg - позитивних) гепатоцелюлярна карцинома розвивається частіше, ніж у хворих з тільки анти - HCV антитілами в сироватці крові [264].

Доведено також, що ймовірність розвитку ГЦР підвищується при спадковому гемохроматозі, неалкогольному стеатогепатиті, альфа-1 антитрипсинівій недостатності, аутоімунному гепатиті, порфірії [44].

Найбільша поширеність ГЦР визначається в країнах Південно-східної Азії та Африки, де частота цієї патології сьогодні наближається до 50-100 на 100000 населення в рік і має постійну тенденцію до зростання. Україна, Росія і європейські країни належать до територій із середньою частотою ГЦР (менше 10 на 100000 населення в рік) [6, 45]. Результати проспективних

досліджень показали, що захворюваність ГЦР щорічно зростає в середньому на 0,5%, а серед пацієнтів з цирозом печінки (ЦП) вірусної С етіології - на 2,5% [132, 237]. У регіонах з високою частотою виявлення ГЦР захворювання розвивається переважно у осіб 30-50 років, тоді як у регіонах з низьким показником захворюваності він розвивається в середньому у осіб 60-70 років [2].

ГЦР визнається одним з найбільш агресивних форм раку [228] та прогностично несприятливою пухлиною [25, 250]. Щорічно у світі від ГЦР вмирає близько 600 тис. чоловік, а однорічна виживаність становить у середньому 13% [100]. У ранній стадії ГЦР розміром менше 5 см протягом року виживає 50-75% хворих, в проміжній стадії при наявності пухлини розміром більше 5 см виживаність хворих становить 16 місяців, а при наявності судинної інвазії або позапечінкового розповсюдження - 6 місяців [87].

Невтішними поки що залишаються результати лікування ГЦР. Після хірургічної резекції ГЦР з пухлинонегативними краями резекції печінки рівень 5-річної виживаності хворих складає 37-55,5% [101, 148], а після ортотопічної трансплантації печінки рост ГЦР поновлюється у 13-27% хворих [177].

Смертність від ГЦР в останні десятиріччя збільшилася в більшості країн, таких як Австрія, Велика Британія, Греція, Данія, Німеччина, Норвегія, Ірландія, Іспанія, Португалія, Росія, США, Швейцарія і знизилася в Італії, Нідерландах, Фінляндії, Франції та Швеції [20, 61, 259].

Холангіокарцинома є другою після ГЦР найбільш поширеною первинною пухлиною печінки [152], яка становить приблизно 3% від усіх шлунково-кишкових ракових захворювань у всьому світі [72, 207, 232] і 10-25% всіх первинних раків печінки [58, 59, 72, 239].

Холангіокарцинома також характеризується значно вираженими географічними відмінностями [232, 233], які корелюють з поширеністю жовчнокам'яної хвороби та глистяних інвазій. В залежності від регіону,

захворюваність на холангіокарциному варіює від 1 до 7 випадків на 100 000 населення [161, 188].

Ендемічними районами по холангіокарциномі є країни Азії, в яких етіологічним фактором розвитку пухлини вважаються гельмінти класу трематод (*Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*) [74, 150, 212, 262], що паразитують у внутрішньопечінкових жовчних протоках. Вони також часто зустрічаються в прибережних річкових районах на території України. Висока захворюваність на холангіокарциному відмічається в Таїланді, Китаї, Японії, Кореї, В'єтнамі, а також деяких районах Індії та Пакистану [82, 90, 210]. У порівнянні з цими країнами, низька захворюваність на холангіокарциному має місце у таких країнах, як Нова Зеландія, Коста-Ріка, Пуерто-Ріко, Ізраїль, Австралія, Канада [179, 232], Іспанія, Польща, Швейцарія, Данія, Франція, Італія та Німеччина [70].

Епідеміологічні дані останніх років вказують на існування причинного зв'язку холангіокарциноми з інфікуванням хворих вірусами гепатиту В і С [222, 223]. Доведено, що вакцинація населення від гепатиту В в ендемічних по вірусному гепатиту В регіонах привела до зменшення захворюваності на холангіокарциному [171].

ХЦР є дуже агресивним видом раку. Рівень 5-річної виживаності хворих на внутрішньопечінковий ХЦР, які не отримали лікування, складає менш ніж 5% [69, 221]. Без лікування хворі на внутрішньопечінковий ХЦР живуть в середньому 18-30 місяців [250], на воротну пухлину - 12-24 місяці [235], після резекції ХЦР вона рецидивує у 60-90% хворих [170]. Після R0 хірургічного видалення ХЦР з пухлинонегативними краями резекції печінки протягом 5 років виживає 9-43% хворих [154], а поновлення росту ХЦР в трансплантованій печінці спостерігається у 35-75% хворих [80].

1.2 Макро- і мікроскопічна характеристика гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки

Первинний рак печінки макроскопічно представлений 3-ма різними видами: масивною, вузловою і дифузною формами [169,185]. Масивна форма первинного раку печінки має два варіанти: масивна проста форма (представлена одним великим вузлом) і масивна форма із сателітами (представлена одним великим вузлом з метастазами по периферії). При вузловій формі раку в печінці зазвичай знаходять декілька порівняно однакових за розміром пухлинних вузлів, розташованих в одній або в обох частках печінки. Вирішити, який з пухлинних вузлів є основним, не представляється можливим. Навколо основних великих вузлів можуть бути дрібні, цілком ймовірно, - метастатичні вузли. Іноді в печінці знаходять дрібні пухлинні вузлики однакової величини, розкидані по всьому органу. У центрі пухлинних вузлів, як великих, так і дрібних, спостерігаються вогнища некрозу з крововиливами. Можливе злиття окремих вузлів і утворення великих конгломератів найрізноманітнішої форми.

Дифузна макроскопічна форма первинного РП зустрічається рідше попередніх видів, вона за зовнішнім виглядом і деякими іншими ознаками значно відрізняється від двох попередніх форм. Така форма первинного РП у більшості хворих виникає на тлі цирозу печінки, пухлина має вигляд нерівномірної інфільтрації або множинних дрібних пухлинних вузлів в обох часточках печінки [169, 185]. Колір пухлинної тканини залежить від секреції жовчі, наявності ділянок крововиливів, некрозу і може коливатися від сірувато-білого до зеленувато-коричневого. Для ГЦР печінки більш характерна м'яка консистенція пухлини. Щільна консистенція свідчить про наявність грубої колагенової строми.

За гістологічною будовою виділяють 4 типи ГЦР [168]. Найбільш часто зустрічається трабекулярний тип, при якому пухлинні клітини формують

трабекули, розділені синусоїдними судинами. Крім цього варіанту хвороби виділяють ацинарний, тубулярний і папілярний типи ГЦР.

Відповідно до класифікації ВООЗ 2010 року в класичному ГЦР рекомендується виділяти 3 основні патерни: псевдозалозистий (ацинарний), компактний (солідний) і трабекулярний [254], а також 7 варіантів пухлини з урахуванням гістоморфології клітин, які переважають в ГЦР [печінковоподібний (полігональні клітини з кулястими ядрами і чіткими ядерцями нагадують гепатоцити), онкоцитарний (пухлинні клітини з поширеною гранулярною цитоплазмою), світлоклітинний (з наявністю пухлинних клітин, цитоплазма яких багата глікогеном або ліпідами), скірозний (з **вираженим** фіброзом строми), низькодиференційований (поліморфноклітинний, з атипією ядер та наявністю хімерних гігантських і багатоядерних клітин), саркоматоїдний (веретенноклітинний), лімфоепітеліоподібний, с наявністю тілець Маллорі і інших внутрішньоклітинних включень]. Ацинарний (псевдозалозистий) патерн характеризується наявністю різноманітних структур у вигляді каналців, які інколи містять в отворах жовч, кістозно розширених порожнин, заповнених фібринозним ексудатом, клітинним детритом або гомогенним речовиною, що нагадує колоїд і додає схожість з фолікулами щитовидної залози. В компактному (солідному) патерні визначається тісне прилягання пухлинних трабекул одна до одної, в результаті чого синусоїди стають майже не помітними і пухлина має будову солідного пласта. В трабекулярному патерні пухлинні клітини формують трабекули, завтовшки з більш ніж 3-5 клітин, розділені синусоїдними судинами.

Особливим варіантом ГЦР є фіброламельлярна карцинома [257]. Вона має більш сприятливий перебіг, виникає на тлі немодифікованої печінки у пацієнтів молодого віку. При цій формі ГЦК клітини пухлини полігональні з виразними ядрами, що містять одиничні ядерця; цитоплазма еозинофільна, зерниста. Поліморфізм клітин виражений слабо, мітози поодинокі. Строма пухлини має вигляд тонких тяжів і пластинок, які поділяють клітини на

окремі вузли. Часто є капсула. У цитоплазмі клітин нерідко визначаються жовчний пігмент, жир, гіалінові тільця. Макроскопічно пухлина має білястий або сірий колір з зеленуватим забарвленням, вона чітко відмежована від здорової печінки і нерідко має в центрі зірчастий рубець.

Для ГЦР використовується градація ступеню гістологічного диференціювання (G – Grading) пухлини, яка розроблена Н.А. Edmondson, Р.Е. Steiner в 1954 році [97] та підтверджена в 2009 році TNM-класифікацією Міжнародного протиракового союзу International Union Against Cancer) та Американським об'єднаним комітетом по раку (American Joint Committee on Cancer) [51, 237].

Залежно від рівня диференціювання клітин пухлини розрізняють G1 – високодиференційований, G2 – помірнодиференційований, G3 – низькодиференційований і G4 – недиференційований гепатоцелюлярний рак [243]. В високодиференційованому ГЦР пухлинні клітини утворюють трабекули, аналогічні нормальній печінці; в помірнодиференційованому ГЦР ядра пухлинних клітин, на відміну від нормальних, більш гіперхромні та більші за розміром, ядерця більш виражені, цитоплазма гранулярна й ацидофільна, залозистоподібні структури часто заповнені жовчу або білковими масами. У низькодиференційованому ГЦР відсутні трабекулярні та залозистоподібні структури, є одиночні пухлинні клітини або солідні ділянки, ізольовані від трабекул, ядра ще більші і гіперхромні, іноді спостерігаються гігантські пухлинні клітини з аномальними гіперхромними ядрами.

В недиференційованому ГЦР клітини не утворюють тканинних структур, ядра їх гіперхромні, займають майже всю пухлинну клітину, цитоплазма базофільна, часто зустрічаються веретеноподібні клітини. Пухлина має інвазивне розповсюдження, особливо характерна інвазія у вени, часто супроводжується тромбозом ворітної вени.

ГЦР метастазує лімфогеним шляхом в регіонарні лімфовузли (лімфовузли воріт печінки, печінкові лімфовузли вузли уздовж власної

артерії печінки, перипортальні лімфовузли [уздовж комірної вени] і лімфовузли уздовж черевного відділу нижньої порожнистої вени вище за ниркові вени), а також гематогенним шляхом (в 50% випадків) [46].

Холангіоцелюлярний рак (ХЦР) у більшості випадків виникає спорадично, його походження і фенотип досі точно не встановлені [165]. Серед усіх субтипів раку гепатобіліарної системи внутрішньопечінковий ХЦР становить 40%, позапечінкова холангіокарцинома воріт печінки (пухлина Клатскіна) - 7%, позапечінкова (дистальна) холангіокарцинома - 53% [61, 175].

Відповідно до класифікації ВООЗ 2010 року [254] внутрішньопечінкова (периферійна) холангіокарцинома гістологічно представлена папілярною аденокарциномою та/або тубулярною аденокарциномою з атипового кубічного або високого циліндричного епітелію, з наявністю фіброзної стромы.

Дистальну холангіокарциному, за макроскопічним типом росту, розподіляють на чотири типи: перидуктально-інфільтративну, поліповидну, екзофітну і змішану [165].

У внутрішньопечінковій холангіокарциномі виділяють чотири типи макроскопічного росту: масивний (мас-формуєчий, об'ємний) тип, перидуктально-інфільтративний тип росту, інтрадуктальний та змішаний (мас-формуєчий+перидуктально-інфільтративний) типи росту [218, 220].

У позапечінковій холангіокарциномі (воротній пухлині Клатскіна і в дистальній холангіокарциномі) класична макроскопічна класифікація також виділяє нодулярний мас-формуєчий тип, перидуктально-інфільтративний (склерозуючий) тип і внутрішньодуктальний папілярний тип [218].

Відповідно до TNM-класифікації злоякісних пухлин Міжнародного протиракового союзу 2009 року [237] позапечінкову холангіокарциному стадіють таким чином:

Tis - Карцинома in situ (рак на місці) (внутрішньопотокова пухлина).

T1 - Солітарна пухлина без судинної інвазії.

T2a - Солітарна пухлина з наявністю судинної інвазії.

T2b - Множинні первинні вогнища пухлини з або без судинної інвазії.

T3 - Пухлина проростає вісцеральну очеревину або безпосередньо проростає в сусідні позапечінкові структури.

T4 - Пухлина з навколопротоковою інвазією (навколопротокове розповсюдження).

Виділяють наступні ступені гістологічного диференціювання (Grading) позапечінкової холангіокарциноми:

- GX: ступінь диференціювання не може бути визначена.

- G1: високодиференційована холангіокарцинома.

- G2: помірнодиференційована холангіокарцинома.

- G3: низькодиференційована холангіокарцинома.

- G4: недиференційована холангіокарцинома.

Внутрішньопечінкова холангіокарцинома, внаслідок багаторічної невизнаності її морфогенетичних особливостей, отримала своє стадіювання і градацію з 2002 року. Відповідно до TNM-класифікації злоякісних пухлин Міжнародний протираковий союз (UICC) виділив такі стадії внутрішньопечінкової холангіокарциноми [236]:

Tx – первинну пухлину неможливо визначити.

T0 – даних за первинну пухлину не має.

T1 - Солітарна пухлина без судинної інвазії

T2 - Солітарна пухлина з наявністю судинної інвазії або множинні пухлини менш ніж 5 см.

T3 – Множинні пухлини більш ніж 5 см або пухлина, що залучає крупні гілки порталної або печінкової вени.

T4 - Пухлина з прямою інвазією прилеглих органів або з проростанням у вісцеральну очеревину.

Американський об'єднаний комітет раку (AJCC) в 2010 році стадіював внутрішньопечінкову холангіокарциному наступним чином [122]:

Tx – первинну пухлину неможливо визначити.

T0 – даних за первинну пухлину не має.

Tis - Карцинома in situ (внутришньопротокова пухлина).

T1 - Солітарна пухлина без судинної інвазії.

T2a - Солітарна пухлина з наявністю судинної інвазії.

T2b - Множинні первинні вогнища пухлини з або без судинної інвазії.

T3 - Пухлина проростає вісцеральну очеревину або локально залучає позапечінкові структури шляхом прямої інвазії.

T4 - Пухлина з навколопротоковою інвазією.

Ступені гістологічного диференціювання (Grading) внутрішньопечінкової холангіокарциноми засновані на порівняльному вимірюванні пухлинних і здорових клітин. Вони не відрізняються в градаціях Міжнародного протиракового союзу (UICC) 2002 року і Американського об'єднаного комітету раку (AJCC) 2010 року. Виділяють наступні градації диференціювання внутрішньопечінкової холангіокарциноми:

- G1: високодиференційована холангіокарцинома (пухлинні клітини дуже походять на нормальні клітини біліарних проток).

- G2: помірно диференційована холангіокарцинома (за розмірами пухлинні клітини помірно аномальні).

- G3: низькодиференційована холангіокарцинома (за розмірами пухлинні клітини значно аномальні і не схожі з нормальними клітинами біліарних проток).

- G4: недиференційована холангіокарцинома за розмірами пухлинні клітини дуже аномальні і значно відрізняються від нормальних клітин біліарних проток).

Внутрішньопечінкова холангіокарцинома також градується на G1, G2, G3, G4 карциному з урахуванням різного ступеню десмоплазії [229].

Сучасні патоморфологічні класифікації Міжнародного протиракового союзу (UICC) підтримують гістологічні варіанти внутрішньопечінкових холангіокарцином, які були описані в 1998 році T.Nakajima, Y.Kondo, M.Miyasaki, K.Okui: залозисто-плоскоклітинний, світлоклітинний, колоїдний,

мукоепідермоїдний, лімфоепітеліоподібний, рабдоїдний, перснеподібно-клітинний.

Внутрішньопечінкова холангіоцелюлярна карцинома має найгірший прогноз, медіана виживаності пацієнтів становить 24 місяці після її діагностики [224].

Найбільш суттєві і суперечливі нові погляди на морфогенез внутрішньопечінкової холангіокарциноми опубліковані в останні роки. Внутрішньопечінкова холангіокарцинома класифікаційно підрозділяється на традиційну (периферичну - з дрібних протоків і перихілюсну - з великих протоків), жовчно-протокову або внутрішньопротокову, і рідкісні варіанти: комбіновану гепато-**холагіоцелюлярну** карциному, недиференційовану холангіокарциному і залізисто-плоскоклітинну карциному [197]. Одними авторами припускається, що дистальна (позапечінкова) і перихілюсна холангіокарцинома походить з біліарного епітелію протоків і перибіліарних залоз [63], а іншими авторами - що, внутрішньопечінкова холангіоцелюлярна карцинома може розвиватися з печінкових прогеніторних клітин або з прогеніторних клітин холангіоцитів [224]. За даними М. Komuta зі співавторами [139] холангіоцелюлярна карцинома походить з топографічно різнорідних холангіоцитів: з циліндричних муцин-продукуючих холангіоцитів, які локалізовані у великих жовчовивідних протоках, і з кубоїдальних муцин-негативних холангіоцитів, локалізованих в холангіолах, що містять біпотенціальні печінкові прогеніторні клітини. Холангіоцелюлярна карцинома воріт печінки і внутрішньопечінкова **мис-холангіоцелюлярна** карцинома містить тільки муцин-позитивні пухлинні клітини, в той час як змішана внутрішньопечінкова холангіоцелюлярна карцинома має змішані гістологічні властивості (містить зони клітин гепатоцитарного диференціювання та/або дуктулярні зони). Мис-внутрішньопечінкова холангіоцелюлярна карцинома становить 60,8% внутрішньопечінкових лімфогеним шляхом карцином і має клініко-патологічний, іммуногістохімічний і молекулярний профіль, подібний

холангіоцелюлярній карциномі воріт печінки (з муцин-продукуючих холангіоцитів), тоді як змішана внутрішньопечінкова холангіоцелюлярна карцинома, яка складає 39,2% внутрішньопечінкових холангіоцелюлярних карцином, має профіль змішаної внутрішньопечінкової холангіоцелюлярної карциноми, що походить з біпотенціальних печінкових прогеніторних клітин (з наявністю дифузно-гепатоцитарного і дуктулярного компартментів).

У результаті молекулярно-імуногістохімічних досліджень [192] розроблена субкласифікація внутрішньопечінкової холангіокарциноми, в якій виділяють 2 субтипи: жовчно-протокову і холангіолярну. Холангіолярний субтип холангіокарциноми побудований з кубоїдальних і низьких стовпчастих пухлинних клітин з незначною цитоплазмою і частою експресією N-кадгерину. Внутрішньопечінкова холангіокарцинома холангіолярного типу часто асоційована з вірусним гепатитом. Пацієнти з цим типом пухлини мають більш ніж 5-річну медіану виживаності, чим відрізняються від пацієнтів з внутрішньопечінковою холангіокарциномою жовчно-протокового типу. Жовчно-протоковий тип внутрішньопечінкової холангіокарциноми складається з високого стовпчастого пухлинного епітелію, що становить крупно-залозистий патерн. Молекулярні властивості внутрішньопечінкової холангіокарциноми жовчно-протокового типу схожі з такими холангіокарциноми воріт печінки.

За даними С. Semroux зі співавторами [229] класична внутрішньопечінкова холангіокарцинома (54.8%), що характеризується тубулярним, залозистим або гніздовим (солідно клітинним) патернами росту, асоційована з пухлиною розміром більше 5 см і відсутністю попередніх захворювань печінки та/або вираженого фіброзу. Некласичну внутрішньопечінкову холангіокарциному (45.2%) складають пухлини з трабекулярною архітектурою, пухлини з властивостями позапечінкових карцином, а також карциноми, що походять з печінкових прогеніторних клітин, комбіновані гепатоцелюлярні/холангіоцелюлярні карциноми і внутрішньопечінкові холангіоцелюлярні карциноми дуктулярного типу.

Вони були більш дрібними і часто мали взаємозв'язок з хронічними вірусними гепатитами та/або з істотним фіброзом.

У 2015 році Y.Nakanuma і співавтори [198] запропонували нову патоморфологічну класифікацію холагіокарцином, засновану на прогресі у вивченні передпухлинних змін в холагіокарциномі, а також на походженні холагіокарцином з стовбурових/прогеніторних клітин. Вони підтвердили розподіл холагіокарцином в залежності від анатомічного розташування на внутрішньопечінкову, воріт печінки (Клатскіна) і дистальну холагіокарциному. Внутрішньопечінкова холангіокарцинома класифікується ними на традиційну (класичну) дуктальну і жовчно-дуктулярну. Внутрішньопечінкова жовчно-дуктулярна холангіокарцинома нагадує проліферуючі жовчні дуктули і експресує маркери стовбурових/прогеніторних клітин печінки. Ворітна холангіокарцинома Клатскіна та дистальна холагіокарцинома з жовчно-вивідних проток являє собою аденокарциному ацинарного, тубулярного, альвеолярного або папілярного типу, в якій продукуються муцини. Порівняння фенотипу печінкових стовбурових клітин, локалізованих в каналцях Герінга, і біліарних стовбурових/прогеніторних клітин, локалізованих в перибіліарних залозах внутрішньопечінкового або позапечінкового біліарного дерева, показало, що в біліарних стовбурових/прогеніторних клітинах має місце експресія маркерів поліпотентних стовбурових клітин (Nanog, OCT4) або дефінітивної ендодерми (LGR5, CXCR4, FoxA2) і панкреатичних прогеніторних клітин (PDX1, NGN3), в той час як печінкові стовбурові клітини з каналців Герінга були негативними за ранніми ендодермальними маркерами [65].

ХЦР метастазує лімфогенним і гематогенним шляхом. Для ХЦР правої долі печінки регіональними лімфатичними вузлами є вузли воріт печінки (загальної жовчної протоки, печінкової артерії, комірної вени і міхурної протоки), навколoduоденальні і навколопанкреатичні лімфатичні вузли, лівої долі печінки - вузли воріт печінки і шлунково-печінкові лімфатичні вузли.

Враховуючі короткі терміни виживання хворих на первинний рак печінки в останні роки особлива увага приділяється виявленню так званого раннього раку печінки, при радикальному лікуванні якого можна домогтися 50-75% п'ятирічної виживаності хворих [76]. У діагностиці раннього раку печінки (одиначної пухлини розміром менше 5 см або 3-х пухлинних вузлів в печінці менше 3-х см) провідну роль відіграють томографія печінки і черезкожних трепанобіопсія печінки під контролем УЗД. Діагноз раку печінки ставиться на підставі патоморфологічного дослідження. Діагноз також вважається обґрунтованим, якщо при цирозі печінки при динамічній КТ, МРТ виявляється характерна для гепатоцелюлярного раку васкуляризація (посилення в артеріальну фазу і «вимивання» в портальну фазу). Біопсія пухлини в печінці показана при виявленні будь-якого пухлинного утворення в нециротичній печінці; малому розмірі пухлини (<2 см) і типовому для ГЦР кровотоці; нетиповою васкуляризацією вузла розміром > 2 см; розбіжностях в описі і трактуванні контрастних динамічних досліджень у поєднанні з нормальним, або незначно підвищеним рівнем альфа-фетопrotein [7].

При патоморфологічній верифікації первинної пухлини печінки в трепанобіоптаті з обмеженим обсягом пухлинного матеріалу виникає необхідність диференціальної діагностики внутрішньопечінкового холангіоцелюлярного раку і гепатоцелюлярного раку, які мають подібні по мікроструктурі солідноклітинні, залозістоподібні, дуктулоподібні та фіброзно-циротичні патерни [163, 164, 244], а також метастазів у печінку злякисних пухлин інших органів, що мають в печінці солідно-клітинну, тубулярну, залозістоподібну мікроструктуру з наявністю, або без наявності фіброзної стромы. Однак данні про імуногістохімічну диференціальну діагностику первинних і метастатичних пухлин невстановленої первинної локалізації, які можна було би використовувати в пункційних трепанобіоптатах печінки, поки в літературі відсутні.

1.3 Диференційна імуногістохімічна характеристика гепатоцелюлярного, холангіоцелюлярного раку печінки та метастазів в печінку

Повноцінного скринінгового методу для діагностики ГЦР та ХЦР печінки на даний момент немає. У людей, що знаходяться в групі ризику раку печінки, проводять профілактичні огляди і вимірюють альфа-фетопротейн (норма 15 нг\мл), але цей аналіз не має великої достовірності і нерідко дає як хибнонегативні, так і хибнопозитивні результати. Для візуалізації пухлини застосовується ультразвукове дослідження (УЗД) печінки, комп'ютерна томографія (КТ), магнітно-резонансна томографія (МРТ), ангіографія, позитронна емісійна томографія (ПЕТ) [124].

Незважаючи на перелічені методи діагностики, діагноз "рак печінки" може бути встановлений тільки на підставі патоморфологічного дослідження черезшкірного трепанобіоптату печінки або матеріалу діагностичної операції. При звичайному гістологічному дослідженні трепанобіоптату іноді дуже складно відрізнити ГЦР від ХЦР, та відрізнити їх від метастазів в печінку раку іншої первинної локалізації, які реєструють в 30 разів частіше, ніж первинні пухлини [127, 162]. За результатами розтинів більш ніж 94 тисяч онкохворих вчені США зробили висновок, що в кінці 20 століття метастатичні пухлини печінки виявлялися в 18-41 разів частіше, ніж первинні пухлини печінки. Найбільш частою первинною локалізацією метастатичного раку печінки були рак жовчного міхура, підшлункової залози і товстої кишки, а метастази в печінку пухлин невідомої первинної локалізації в гепатобіоптатах становили 57% [128, 209]. В останні роки, за даними Z.D. Goodman [127], H.U. Kasper et al. [162], співвідношення метастатичних вражень печінки і первинного раку печінки складають 30 к 1, при цьому в нециротичній печінці домінують метастази раку легенів, підшлункової залози, шлунка, товстої кишки, молочної залози, а метастази нейроендокринних пухлин складають 16%.

Патологоанатомічні характеристики метастатичних пухлин печінки повторюють такі первинних пухлин - джерел метастазів в печінку. Але дуже часто злякисні пухлини іншого гістогенезу та первинної локалізації, в печінці можуть мати подібну до ГЦР та ХЦР печінки солідно-клітинну, гніздно-клітинну, дуктулоподібну, трабекулярну, тубулярну, залозисту і залозистоподібну мікроструктуру, що затрудняє їх диференційну діагностику, особливо в трепанобіоптатах печінки з обмеженим обсягом пухлинного матеріалу. Тому в патоморфологічній діагностиці цих пухлин вирішальне значення мають імуногістохімічні (ІГХ) методи дослідження [43]. Без ІГХ досліджень практично неможливо розпізнати гепато- або холангіоцелюлярний фенотип солідноклітинного і низько диференційованого раку, неможлива диференційна діагностика в тих випадках, коли в трепанобіоптаті не потрапляють характерні патерни гепатоцелюлярного раку або тубулярний патерн холангіоцелюлярного раку.

Для диференціальної ІГХ діагностики ГЦР, ХЦР печінки і метастазів в печінку інших пухлин використовується імуногістохімічна панель, в якій найчастіше визначають експресію пухлинними клітинами гепатоцитарного специфічного антигену (HepPar 1), α -фетопроतेїну (AFP), поліклонального карциноембріонального антигену (pCEA), протеоглікана фетальної печінки (глпїкана-3), муцикарміна, цитокератинів: CK7, CK8, CK18, CK19, CK20 [53, 123], а також тиреоїдного транскрипційного фактора-1 (TTF-1), CD56 (NCAM), клаудина, вілліна і муцинів (MUC1, MUC2, MUC4) [244].

Найчастіше в панелі маркерів для діагностики ГЦР печінки використовують антитіло HepPar-1, яке реагує з ферментом карбаміл-фосфатсинтазою-1 мітохондрій печінки. Але в останні роки стало відомо, що HepPar-1 не є специфічним антигеном гепатоцитів печінки, він також реагує з мітохондріями епітелію каналців нирок і кишкового епітелію. Згідно літературних даних HepPar-1 імунореактивність різного рівня (в середньому 15%) може спостерігатися в клітинах раку легені, підшлункової залози, шлунка, стравоходу, жовчного міхура, тонкої кишки, наднирників, сечового

міхура, в меланомі і парагангліоми [140]. На матеріалі дослідження 3940 зразків тканини A. Lugli та ін. (2004) [138] встановили, що низький рівень позитивної забарвлення з HerPar-1 можуть мати менш ніж 15% інших пухлин (шлункові, легеневі, тонкокишечні, товстокишкові і панкреатичні аденокарциноми, меланоми та 16.7% холангіокарціноми). Однак, HerPar-1 визнано найбільш адекватним маркером ГЦР печінки, тому що його експресія визначається в цій пухлині у 80-90-100% хворих [81, 138, 145, 267]. Деякі дослідники вважають достатньою для діагностики ГЦР виявлення помірної або сильної експресії HerPar-1 не менш ніж у 10% пухлинних клітин [253]. У той же час A.Lugli et al. [138] вказують на те, що експресія HerPar-1 визначається тільки в деяких ХЦР.

Альфа-фетопротейн (AFP) є глікопротеїном, який продукується ембріональними клітинами плода в фетальному шлунково-кишковому тракті, печінці та жовточному мішку [43]. Причини експресії AFP в ГЦР печінки дорослих хворих поки не встановлені. Згідно з гіпотезою A.S.Gleiberman, G.I. Abelev (1985) AFP продукується в ембріогенезі диференційованими клітинами, похідними ембріональних клітин-попередників. Відповідно до цієї гіпотези, стовбурові клітини пухлин частково зберігають здатність диференціюватися в ембріоспецифічні клітини. В злоякісній пухлині печінки з порушеними міжклітинно-клітинно-матриксними взаємодіями і зниженим рівнем диференціювання нових поколінь пухлинних клітин, з'являються ембріоспецифічні клітини, які пригнічують синтез AFP печінковими клітинами дорослої людини [3, 125]. Вважається, що експресія AFP специфічна для гепатоцелюлярного диференціювання злоякісних пухлинних клітин, проте дані про рівень його експресії суперечливі. Одні патологи вказують на високий рівень експресії AFP в гепатоцелюлярному раку [43], інші відзначають вогнищевий характер експресії AFP, який виявляється в 17% -61,5% ГЦР, а також низьку чутливість пухлини до цього маркеру [54]. В зв'язку з цим, S. Kakar et al. [54] взагалі не рекомендують використовувати AFP для діагностичної панелі ГЦР. В 2009 році міжнародна консенсусна

група звернула увагу на невисоку (близько 30%) чутливість клітин гепатоцелюлярної карциноми до альфа-фетопротейну [251]. Koehne de Gonzalez A.K et al. вважають, що позитивна експресія альфа-фетопротейну в пухлинах жовткового мішка і в 97% дуже дрібних метастатичних аденокарцином і холангіокарцином, взагалі обмежує його диференційно-діагностичне значення [86].

Експресія ЕМА - трансмембранного глікопротеїну з цитоплазматичними та позаклітинними доменами, має місце в 20-40% гепатоцелюлярних карцином [53].

В основі використання антитіл до цитокератинів для диференційної імуногістохімічної діагностики первинного раку печінки у дорослих лежить ідея про те, що найбільш імовірним джерелом гепатоцелюлярної, холангіоцелюлярної і змішаної гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярної карциноми є печінкові прогеніторні клітини, які локалізовані в каналцях Геринга та в нормі диференціюються в гепатоцити і в холангіоцити [24, 151, 244]. Отже, пухлинні гепатоцити (як і в нормі) зберігають експресію низькомолекулярних цитокератинів 8 і 18, а клітинам ХЦР (як і холангіоцитам) властива експресія цитокератинів 7, 19 та 20 [244]. Згідно з L.L. Ferrel et al. [118]. У зрілих гепатоцитах не виявляється експресія СК7, СК19, СК20, епітеліального мембранного антигену (ЕМА) і віментину; в той же час внутрішньопечінкові жовчовивідні протоки іммунопозитивні до цитокератини 7, 8, 18, 19, але іммунегативні до цитокератину 20 і карциноембріонального антигену (СЕА) [53, 59]. Вважається, що зазвичай ГЦР СК7-слабо позитивний чи взагалі СК7-негативний [8], а експресія пухлинними клітинами СК7 виявляється в більшості ХЦР [248], тому СК7 вважається найбільш адекватним маркером ХЦР [92], який виявляється в 90-96% цих пухлин [53].

Розширення ІГХ діагностики пухлин продемонструвало, що метастази аденокарциноми в печінку також можуть бути СК7,19 і 20 позитивними. В своїх дослідженнях R.T. Miller [190] вказує на те, що коекспресія СК 7 і

СК20 відзначається в печінкових метастазах папілярного і муцинозного раку молочної залози. Метастази нейроендокринних пухлин в печінці інколи також можуть бути СК7 імунопозитивними [118]. Метастази раку товстої кишки також характеризуються позитивною реакцією з цитокератинами 8, 18, 19, 20, а в метастазах раку підшлункової залози визначається експресія цитокератину 20 в пухлинних клітинах [10]. Тому на даний час чіткого уявлення про цитокератиновий профіль ГЦР, ХЦР і метастатичних пухлин в печінці поки не склалося.

Враховуючи, що серед етіологічних факторів ГЦР важливе значення має гепатотропна В-вірусна інфекція (HBV) [1840] були зроблені спроби використовувати для діагностики ГЦР виявлення HBV-антигенів у клітинах цієї пухлини. Дослідження, проведене W.L. Wang et al . [266], Suzuki K et al. [176] показали, що позитивна експресія HBcAg і HBsAg клітинами пухлини і клітинами навколишньої непухлинної тканини спостерігається не тільки в ГЦР, але і в ХЦР. Експресія HBcAg і HBsAg клітинами ГЦР пояснюється особливостями його вірусного гепатокарціногенеза, що включає як активацію онкогенів так і зниження функції генів - супресорів пухлинного росту, в який залучені HBsAg, HBcAg, p21WAF1/CIP1 и p21 [85, 256]. Феномен експресії HBcAg і HBsAg клітинами ХЦ раку поки ще уточнюється. У деяких випадках експресія HBcorAg і HBsAg клітинами ХЦР раку пояснюється наявністю у серонегативних по маркерами HBV хворих латентної HBV інфекції [22].

Незважаючи на вирішені і невирішені в літературі питання ІГХ характеристики ГЦР і ХЦР, в практичній роботі патологоанатома, при скринінговій патоморфологічній ідентифікації пухлини в трепанобіоптаті печінки з обмеженим обсягом пухлинного матеріалу виникає необхідність диференціювати первинний ХЦР і ГЦР печінки від метастазів у печінку злоякісних пухлин неуточненої первинної локалізації, що мають в печінці подібну мікроструктуру. На даний час оптимальної ІГХ панелі для диференціальної діагностики в пункційних трепанобіоптатах печінки ГЦК,

ХЦК, метастатичних солідно-трабекулярних і тубулярної-залізистих злоякісних пухлин неуточненої первинної локалізації поки не розроблено.

1.4 Прогностичні патоморфологічні параметри гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки

Найбільш важливими біологічними характеристиками раку печінки, які визначають прогноз хвороби, є пухлинна трансформація генів печінкових клітин, порушення співвідношення між рівнями апоптозу та проліферації пухлинних клітин, набуття ними інвазивних і метастатичних властивостей [27].

Провідну роль у регуляції клітинної проліферації та апоптозу відіграє природний онкосупресорний ген p53, який кодує ядерний білок p53, що в свою чергу модулює експресію генів, відповідальних за репарацію ДНК, поділ клітин і апоптоз. При неправильному копіюванні під час мітозу дочірньої ДНК і неможливості її відновлення, ген p53 зупиняє мітоз і, пригнічуючи фосфорилування гена Rb цикліну D1, активує апоптоз клітини з мутантною ДНК. У зв'язку з інактивацією мутантного гена p-53 втрачається p53-залежний апоптоз і контроль над розмноженням змінених пухлинних клітин, триває проліферація пухлинних клітин з іншими активованими онкогенами, знижується також диференціювання пухлинних клітин [202]. Відомо, що природний білок p53 має короткий період напіврозпаду, тому імуногістохімічними методами він практично не виявляється в здоровій тканині [1]. Мутантна форма p53 більш стабільна, мутації гена p53 призводять до збільшення часу напівжиття не функціонуючого білка p53, який накопичується в ядрі [28] і дозволяє визначати p53 імуногістохімічними методиками.

Ряд дослідників [196, 206, 219] виявили зв'язок між зменшенням виживаності хворих і ядерною експресією p53 в ХЦК печінки. Інші автори [48, 155, 189] наполягають на відсутності зв'язку між ядерною експресією p53

та строком життя хворих на холангіокарциному. P. Argani et al. [93] виявили збільшення тривалості життя хворих на p53-позитивну холангіокарциному, в той час як Q.Cheng et al. [94] говорять про незалежну прогностичну значимість ядерної експресії білка p53 клітинами холангіокарциноми.

Вважається, що втрата функції гена p53 зазвичай відбувається на пізніх стадіях гепатоканцерогенеза за рахунок алельних делецій хромосомного локусу 17p13, де розташований цей ген, або мутацій в чотирьох високо консервативних ділянках ДНК-зв'язувального домену, що веде до втрати його ДНК-зв'язувальної активності [202, 252]. За даними повногеномного секвенування в ГЦР перше місце за частотою (35,2%) займають мутації в онкосупресорному гені p53, що кодує протеїн p53, на 2-му місці (15,9%) - мутації в гені CTNNB1, що кодує β -катенін [269]. Мутація гена p53 присутня в 28-61% ХЦР [84, 196, 219].

В процесі розвитку злоякісної пухлини її клітини інтенсивно проліферують, а процес їх апоптозу найчастіше блокується. З іншого боку, фундаментальні і клінічні дослідження підтвердили, що антипухлинні хіміопрепарати знищують клітини пухлини, стимулюючи їх апоптоз. Тому апоптозу пухлинних клітин присвячені дослідження багатьох онкологів. Відомо, що в апоптотичну загибель клітин залучені каспази, які складають 2 групи: каспази, що ініціюють апоптоз (каспази 8, 9 і 10) і ефекторні каспази, що реалізують апоптоз (каспази 2, 3, 6 і 7). Каспаза 3 продукується у функціонуючій клітині поза апоптозом як неактивна про-каспаза 3, яка, за даними імунофлуоресцентного аналізу при конфокальній мікроскопії має конститутивну локалізацію в цитоплазмі і в ядрі. При FAS-індукованому апоптозі активна каспаза 3 спочатку з'являється в цитоплазмі і потім спостерігається в ядрі клітини [83]. Каспаза 3 руйнує структуровані цитоплазматичні протеїни (ламіни) і ДНК-репаруючі ферменти, а також активує ендонуклеази, зокрема каспазо-активована ДНК-аза викликає фрагментацію хромосомальної ДНК на дрібні нуклеосоми [241].

Багато хіміотерапевтичних препаратів або блокують рецептори статевих гормонів в пухлинних клітинах або впливають на внутрішньоклітинну передачу апоптотичних сигналів і стимулюють апоптоз пухлинних клітин [75]. Клітини холангіокарциноми багаті рецепторами до прогестерону і мають дуже високий рівень експресії антиапоптотичного протеїну BCL - 2 [115, 271]. Зокрема, припускають, що деякі хіміопрепарати (мифепристон) можуть активувати апоптоз пухлинних клітин, блокуючи рецептори прогестерону клітин холангіокарциноми [116] або пригнічуючи високий рівень експресії антиапоптотичного протеїну BCL - 2 в клітинах ГЦР і ХЦР [242]. Інтерферон- γ може змінювати регуляцію Fas-опосередкованого апоптозу клітин холангіокарциноми, а тамоксифен, як припускають, може індукувати апоптоз клітин холангіокарциноми як інтерферон [245].

У патологоанатомічній практиці для визначення апоптозу широкого поширення набуло визначення рівня експресії клітинами ферменту апоптотичної деградації каспази-3, а для визначення мітотичного поділу клітин - рівня експресії ядерного білка Ki-67, який експресується тільки у тих клітинах, що діляться. Ki-67 імуногістохімічно виявляється в кінці G1 фази, в G2, S і M-фазах клітинного циклу з максимальною експресією в фазах G2 і M [11]. Вважається, що посилення проліферації клітин злоякісних пухлин позитивно корелює з несприятливим прогнозом.

Важливе значення серед прогностичних маркерів розвитку ГЦК і ХЦК, мають зміни рівня експресії пухлинними клітинами молекул клітинної адгезії (E-кадгерину і β -катеніну), які відіграють важливу роль у механізмах регуляції міжклітинної адгезії, клітинної рухливості, міграції та проліферації епітеліальних клітин. E-кадгерин являє собою кальцій-залежний трансмембранний глікопротеїн, довгі позаклітинні ділянки якого формують на поверхні клітин паралельні димери, які взаємодіють з молекулами E-кадгеринів сусідніх епітеліальних клітин і утворюють міжклітинні контакти типу "адгезійних пасків зчеплення" (zonula adherens). У зоні адгезійного паска цитоплазматичний домен E-кадгеринів взаємодіє з цитоплазматичними

білками (β і γ катеніну), які за участю α -катеніну прикріплюють до внутрішньої мембрани плазмолемі контактуючих клітин актинові мікрофіламенти. Таким чином, кадгерини об'єднують актинові цитоскелети клітин і одночасно забезпечують стабільну міжклітинну адгезію [29], а β -катенін забезпечує зв'язок E-кадгеринів з актиновими мікрофіламентами і бере участь в регуляції реорганізації цитоскелету клітини. В клітині, яка спочіває, вміст вільного (нефосфорильованого) β -катеніну лімітований зв'язуванням з кадгерином і подальшим фосфорилуванням субмембранної тирозінкінази і кінази глікогенсинтази 3 β , а також його деградацією, опосередкованої геном APC (аденоматозного поліпозу кишківника). Зниження експресії на клітинній поверхні E-кадгеринів веде до накопичення в клітині нефосфорильованого β -катеніну, що в свою чергу призводить до регуляторних зрушень проліферації і міграції епітеліальних клітин, а також до посилення проліферації, міграції та інвазивності ракових клітин. Нефосфорильований β -катенін переміщується в ядро, взаємодіє з ядерним фактором транскрипції TCF/LEF-1 і утворює комплекс β -катенін-TCF, який через промоторні ділянки гена цикліну D1 активує транскрипцію цього гена і активує проліферацію клітини. Одночасно LEF-1 впливає на ген кадгерину E, викликаючи його супресію, в результаті чого знижується синтез кадгерину E і послаблюється міжклітинна адгезія, що сприяє підвищенню міграції та інвазивності пухлинних клітин [26, 88].

Jiang Chen et al. [215] розглядають E-кадгерин і β -катенін в якості потенційних прогностичних маркерів перебігу первинного раку печінки. Пригнічення експресії E-кадгерину описано в ГЦР на пізніх стадіях його розвитку, при інвазії і несприятливому прогнозі пухлиної хвороби [28], а накопичення β -катеніну в пухлинних клітинах виявлено на ранній стадії ГЦР [55, 135]. Показано, що зниження експресії E-кадгерину асоційоване зі зниженням адгезії і рухливості клітин ХЦР, з прискоренням канцерогенезу, а також з підвищенням інвазивності пухлини та її поганим прогнозом [215].

Відновлення експресії E-кадгерину в ракових клітинах за допомогою введення генно-інженерних конструкцій викликає різке уповільнення проліферації клітин і перехід пухлини від інвазивного до неінвазивного фенотипу. Причому зростання супресивного ефекту E-кадгерину обумовлюється його здатністю зв'язувати і секвеструвати β -катенін, і не залежить від того, чи відбувається при цьому відновлення міжклітинних контактів [26]. Останні дані також показують, що β -катенін має вирішальне значення для поділу клітин під час ембріонального розвитку печінки [56, 57] і регенерації печінки після її часткової резекції [67]. S.P. Singh Monga [234] наводить аналіз літературних даних про те, що зміна активності β -катеніну, мутації гена CTNNB1 і порушення WNT- β -катенін сигнального шляху спостерігаються у 8-44% хворих на ГЦР. Дані літератури про прогностичне значення мутацій CTNNB1 поки суперечливі, вони асоціювалися як з кращим прогнозом і більш диференційованим типом ГЦР [258], так і з більш проліферуючим, і погано диференційованим типом ГЦР [55, 149]. Відомо, що мутації Wnt- сигнального шляху призводить до накопичення β -катеніну та сприяє онкогенним змінам гепатоцитів [173]. Тому, аномальні активації WNT- β -катенін сигнального шляху виявляються в більшості ГЦР [200].

З інвазивним ростом пухлинних клітин в навколишню тканину, з їх пенетрацією в судини і з метастазуванням гепатоцелюлярного раку пов'язують також експресію матриксних металопротеїназ (ММР) пухлинними клітинами ГЦР [52, 147, 187], а також ХЦР печінки [102, 103].

ММР являє собою родину з більш ніж 20 секретуємих або пов'язаних з поверхнею клітини цинкзалежних ендопептидаз, здатних руйнувати позаклітинний фібрилярно-молекулярний матрикс і базальні мембрани. Активність ММР регулюється тканинними інгібіторами металопротеїназ (TIMP) [182]. Залежно від структурно-функціональних особливостей і субстратної специфічності виділяють кілька субродин ММР, основними з яких є колагенази широкого спектру дії (наприклад, ММР-1, 8, 13), желатинази або специфічні колагенази колагену IV типу (ММР-2 і 9),

стромелізину (наприклад, MMP-3 і 10), матрилізину (MMP-7, MMP-26) і MMP мембранного типу [265]. Відомо кілька механізмів регуляції активності MMP в тканинах, які працюють на різних рівнях: на рівні транскрипції генів клітин-продуцентів MMP, на рівні активації MMP-проферментів і гальмування тканинними інгібіторами активних металопротеїназ. Переважний механізм TIMP полягає в тому, що вони в еквімолярних співвідношеннях зв'язуються з каталітичним сайтом активного ферменту MMP, перешкоджаючи його активності, а також з карбоксильним кінцем MMP-профермента, запобігаючи його активації [110]. Таким чином, взаємодія MMP і TIMP відіграють важливу роль у підтримці балансу позаклітинного волокнисто-молекулярного матриксу органів.

В останнє десятиріччя з'явилися публікації про наявність експресії MMP і TIMP клітинами ГЦР і ХЦР печінки [49, 110], але значення різних рівнів експресії цих ферментів клітинами пухлини і навколишньої тканини вивчено недостатньо.

Не менш важливе значення для прогнозуванні перебігу раку печінки має розмір пухлини на момент її діагностики. Згідно з даними багатофакторного аналізу, виконаного М. Maluccio, А. Covey [183] до несприятливих прогностичних факторів ГЦР відноситься розмір пухлини 5 см і більше, а також наявність 5 пухлинних вузлів або більше і позапечінкове поширення пухлини. J.M. Llovet et al. [175], також вважають, що маленькі пухлини (діаметром до 5 см), як правило, більш резектабельні, тому пацієнти з такими пухлинами мають велику ймовірність виживання та довгострокові перспективи після оперативного видалення або інших способів лікування [101]. За результатами великого ретроспективного аналізу бази даних служби забезпечення донорськими органами (UNOS), тривалість життя хворих з розміром пухлини 3-5 см і більше, була значно меншою порівняно з хворими з меншим розміром пухлини [156].

Таким чином, аналіз літературних джерел показав, що, незважаючи на наявність значної кількості робіт з патоморфологічних досліджень ГЦР та

ХЦР, найменш вивченим залишається внутрішньопечінковий ХЦР. У зв'язку з неоднорідною експресією диференційно-діагностичних антигенів пухлинними клітинами та їх різною чутливістю до імуногістохімічних маркерів поки ще не розроблені чіткі імуногістохімічні диференційні параметри ГЦР та ХЦР, а також не визначені чіткі рівні експресії диференційно-діагностичних імуногістохімічних маркерів клітинами цих пухлин. Поки ще залишається дискусійним питання використання α -фетопротейну при диференційній діагностиці ГЦР та ХЦР печінки, а також питання відмінностей цитокератинового профілю цих пухлин.

До цього часу недостатньо вивчена прогностична роль для перебігу ГЦР та ХЦР експресії пухлинними клітинами матриксних металопротеїназ та їх інгібіторів, а також прогностична роль різних рівнів імуногістохімічної експресії маркерів проліферації і апоптозу пухлинними клітинами, та молекул міжклітинної адгезії E-кадгерину і β -катеніну.

Недостатньо розроблені для трепанобіоптатів печінки диференційні імуногістохімічні відмінності між солідноклітинними варіантами ГЦР, ХЦР та солідноклітинними метастазами рака в печінку, залишаються мало вивченими відмінності між фіброзно-циротичними варіантами ГЦР та ХЦР. Поки відсутня оптимальна імуногістохімічна панель для диференційної діагностики в пункційних трепанобіоптатах печінки ГЦР, ХЦР та метастатичних солідно-трабекулярних і тубулярно-залозистих пухлин невстановленої первинної локалізації.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали дослідження

Роботу виконано на матеріалі пункційних черезшкірних трепанобіоптатів печінки 181 хворого на первиний та метастатичний рак печінки. В патоморфологічну лабораторію первинні трепанобіоптати печінки поступали з клінічним діагнозом: рак печінки-?, пухлина печінки-?, метастаз в печінку пухлини іншої невстановленої первинної локалізації-?

Для вивчення диференційних імуногістохімічних ознак пухлин було виділено 3 групи спостережень: I групу склали 55 хворих на ГЦР, II групу - 39 хворих на внутрішньопечінковий мас-формуєчий ХЦР печінки [крім цього, у 2 хворих вивчено комбінований гепато-холангіоцелюлярний рак печінки], III групу склали 85 хворих на метастатичні пухлини печінки (МПП). Холангіокарцинома воріт печінки (пухлина Клатскіна), позапечінкова холангіокарцинома та карцинома жовчного міхура не включалися в дисертаційне дослідження.

Мікроскопічні, гістохімічні, імуногістохімічні і морфометричні особливості ГЦР та ХЦР печінки вивчені у 96 хворих віком від 26 до 83 років (жінок - 36, чоловіків - 60), які за видом первинного раку печінки (ПРП) розподілилися наступним чином (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Кількісна характеристика досліджених хворих на первинний рак печінки, діагностований в трепанобіоптатах печінки

Вид діагностованого первинного раку печінки	Кількісно-відсотковий розподіл	
	Кількість хворих	Відсоток від усіх випадків діагностованого раку печінки
Гепатоцелюлярний рак	55	57,29%
Холангіоцелюлярний рак	39	40,61%
Комбінований гепато-холангіоцелюлярний рак	2	2,1%

Першу групу склали 55 хворих на гепатоцелюлярний рак печінки (57,29% первинного раку печінки), другу групу спостережень склали 39 хворих на внутрішньопечінковий мас-формуєчий холангіоцелюлярний рак печінки (40,61% первинного раку печінки), крім цього, у 2 хворих (2,1% первинного раку печінки) вивчено рідкісний комбінований гепато-холангіоцелюлярний рак печінки.

Для ІГХ досліджень використано 13,8% гепатотрепанобіоптатів хворих на рак печінки з архіву кафедри. У 2-х випадках комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку та у 2-х випадках ГЦР на тлі цирозу печінки первинні дослідження гепатобіоптатів були підтверджені аутопсійним патоморфологічним дослідженням печінки померлих хворих.

Інфікування пухлинних клітин вірусом гепатиту В вивчені у 87 хворих, серед яких 50 (57,47%) осіб хворіли на ГЦР і 37 (42,53%) - на ХЦР. За клінічними даними з цих пацієнтів тільки 15 осіб раніше хворіли на хронічний вірусний гепатит (11 - на ХВГ С, 3 – на ХВГ В, 1 – на ХВГ В + С)

Прогностично несприятливі параметри ГЦР і ХЦР печінки вивчені у 94 хворих з урахуванням розмірів пухлин, визначених при ультразвуковому дослідженні (УЗД) перед трепанобіопсією печінки: проведено ІГХ і МФМ аналіз невеликих (розміром до 5 см) пухлин [21 ГЦР і 17 ХЦР] у 38 хворих, а також великих (розміром більше 5 см) пухлин [34 ГЦР і 22 ХЦР] у 56 хворих з одиничними або множинними вузлами раку печінки (таблиця 2.2).

Таблиця 2.2

Кількість досліджених хворих на первинний рак печінки різного розміру

Вид первинного раку печінки	Кількість пацієнтів	
	з пухлиною розміром до 5 см	з пухлиною більше 5 см
Гепатоцелюлярний рак	21	34
Холангіоцелюлярний рак	17	22
Всього хворих	38	56

Третю групу спостережень склали 85 хворих на метастатичний рак печінки. З урахуванням мікроскопічної будови метастазів та даних УЗД і комп'ютерно-томографічних досліджень для диференційного ІГХ аналізу була виділена підгрупа з 36 хворих, у яких метастази в обмеженому за об'ємом трепанобіоптаті печінки мали солідно-клітинну і трабекулярну структуру (42,35% від усіх метастатичних пухлин) та підгрупа з 49 хворих, у яких метастази інших пухлин мали в печінці тубулярну і залозисто-ацинарну мікроструктуру (57,65% від усіх метастатичних пухлин). Таким чином, гістологічними, гістохімічними і ІГХ методами серед метастатичних пухлин солідно-трабекулярної структури були вивчені метастази меланоми (у 12 хворих), раку молочної залози (у 10 жінок), нейроендокринних пухлин (у 12 хворих) та раку передміхурової залози (у 2 чоловіків); а серед метастатичних пухлин тубулярної і залозисто-ацинарної мікроструктури були досліджені метастази колоректального раку (у 17 хворих), протокового раку підшлункової залози (у 12 хворих), аденокарциноми шлунку (у 10 хворих), нирковоклітинного раку (у 6 хворих), раку легень (у 4 хворих) (таблиця 2.3).

Таблиця 2.3

Нозологічна та кількісна характеристика досліджених хворих на метастатичний рак печінки в залежності від мікроструктури метастазів

Нозологія діагностованих метастазів в печінку	Кількість хворих з метастатичними пухлинами певної мікроструктури		Всього хворих з метастазами в печінку
	солідно-трабекулярної	тубулярної і залозисто-ацинарної	
Злоякісна меланома	12	0	12
Рак молочної залози	10	0	10
Нейроендокринний рак	12	0	12
Рак передміхурової залози	2	0	2
Колоректальний рак	0	17	17
Рак підшлункової залози	0	12	12
Рак шлунка	0	10	10
Нирковоклітинний рак	0	6	6
Рак легень	0	4	4

ІГХ аналіз метастатичних пухлин печінки у 18 хворих (9,9% від загального числа досліджень) був проведений спільно зі співробітниками ІГХ лабораторії Запорізького обласного патологоанатомічного бюро.

2.2 Методи та методики досліджень

Черезшкірні пункційні трепанобіопсії печінки виконувалися хірургом у 3-й клінічній лікарні м. Запоріжжя голками Uni-Cut і BioCut 14-16G під контролем апарату УЗД Conbizon-320-5 Ultima-Pro-30 з використанням секторального і конвексного датчиків з ультразвуковою частотою випромінювання першого датчика 3-4 МГц, і 3,5 МГц – другого датчика. В результаті пункції одержували 2-3 стовпчики тканини печінки, завдовжки 1,5 см, що відповідало стандарту для подальшого патоморфологічного дослідження трепанобіоптата.

Для патоморфологічного дослідження стовпчики трепанобіоптатів печінки фіксували в забуференому 10% формаліні і заливали в парафін. На прецизійному ротаційному мікротомі HM 3600 (фірми «MICROM Laborgerate GmbH» – Німеччина) виготовляли серійні стандартні зрізи завтовшки 4 μм, які розміщали на звичайні предметні скельця (для оглядового патогістологічного забарвлення) або на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» фірми «DAKO» (Данія) - для імуногістохімічних досліджень.

Комплексне патоморфологічне дослідження трепанобіоптатів печінки проводилось гістологічними, гістохімічними, ІГХ і морфометричними (МФМ) методиками. Для діагностики мікроструктури пухлин зрізи трепанобіоптатів печінки забарвлювали гематоксиліном і еозином, для визначення фіброзу зрізи забарвлювали за Ван-Гізоном та за Масоном-триколор.

ІГХ дослідження трепанобіоптатів печінки виконувались в парафінових зрізах з використанням моноклональних та поліклональних антитіл. Після депарафінізації і регідратації зрізів проводили високотемпературне демаскування антигенів нагріванням на водяній бані в

цитратному (pH=6,0) або в Трис-ЕДТА (pH=9,0) буфері, подавляли активність ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню та наносили блокуючу сироватку. Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників, візуалізацію ІГХ-реакції виконували з використанням системи детекції DAKO EnVision+System («ДАКО», США) з діамінобензидином (DAB). Зрізи дозabarвлювали гематоксилином Майєра і заключали в канадський бальзам. Оцінку результатів ІГХ-реакції проводили в мікроскопі AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Німеччина) та документували цифровою фотокамерою Camedia C5060WZ (Olympus, Японія).

Рівні ІГХ експресії HepPar-1, AFP, CK7, CK20 клітинами первинного раку печінки, а також площі, яку займали в зрізах пухлини відповідні імунопозитивні клітини, були вивчені в черезшкірних трепанобіоптатах пухлин у 53 хворих на ГЦР і у 23 хворих на ХЦР. Експресію гепатоцитарного антигену HepPar-1 визначали з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu Hepatocyte* [аналог HepPar-1] (Clone OCH1E5, («ДАКО», США), експресію α -фетопротеїну (AFP) - поліклональними антитілами *Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein* («ДАКО», США). Цитокератиновий профіль пухлинних клітин вивчали із застосуванням моноклональних антитіл *Mo a-Hu Cytokeratine 7* (Clone OV-TL 12/30, «ДАКО», США) і *Mo a-Hu Cytokeratine 20* (Clone Ks20.8, «ДАКО», США).

Рівні експресії пухлинними клітинами HepPar-1, AFP, CK7 і CK20 кількісно оцінювали запатентованим методом фотоцифрової морфометрії, при якій мікропрепарати раку печінки з відповідною імунопозитивною реакцією фотографували цифровою фотокамерою «Olympus 3040» (Японія) в мікроскопі AxioPlan 2 «Carl Zeiss» (Німеччина) при збільшенні $\times 200$ в 5 полях зору і надалі аналізували з використанням програми обробки цифрових зображень Image J [Rasband WS (1997-2012)]. У плагіні Colour Deconvolution цієї програми у вбудованій схемі аналізу «гематоксилин + DAB» за рівнем DAB-фарбування визначали інтенсивність експресії відповідних

імуногістохімічних маркерів, кількісно градували її в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ) від 0 - білий до 255 - чорний та розбивали її 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.

Наявність інфікування пухлинних клітин вірусом гепатиту В визначали з використанням поліклональних антитіл *Rb a-Hu Primary Hepatitis B Virus Core Antigen* (HBcAg) («ДАКО», Данія) і моноклональних антитіл *Mo a-Hu Primary Hepatitis B Virus Surface Antigen* (HBsAg), (Clone 3E7, «ДАКО», Данія). Рівень експресії HBcAg і HBsAg в пухлинній тканині ГЦР і ХЦР розцінювали як слабкий - за наявності 1-33% імунопозитивних клітин, як помірний - при наявності 34-66% імунопозитивних клітин і як значно виражений - при наявності 67-100% імунопозитивних клітин. Інтенсивність експресії HBcAg і HBsAg пухлинними клітинами ГЦ і ХЦ раку оцінювали напівкількісним методом за K.Liu et al. [260] наступним чином: «-» - негативна ІГХ реакція; «+» світло-коричневе забарвлення - слабка інтенсивність експресії; «++» коричневе забарвлення - помірна інтенсивність експресії і «+++» темно-коричневе забарвлення - виразна інтенсивність експресії.

Проліферативну активність пухлинних клітин печінки визначали з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu Ki-67 Antigen* (Clone MIB-1, «ДАКО», США), рівень апоптозу в пухлинних клітинах - з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3*, (Clone 3CSP03, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) та *Mo a-Hu p53 Protein* (Clone DO-7, «ДАКО», США). Результати імуногістохімічної реакції з Ki-67, p53 та каспазою-3 оцінювали шляхом підрахунку відсотку позитивно забарвлених клітин в стандартизованому полі зору мікроскопа AxioPlan 2 «Carl Zeiss» (Німеччина) при збільшенні x200, у кожному випадку аналізували 200 клітин в 5 полях зору.

Рівень проліферативної активності пухлинних клітин визначали за

ядерною експресією Ki-67 в балах (Risberg B. et al., 2002): 0 балів = 0–5% клітин з імунопозитивними ядрами, 1 бал = 6–25% клітин, 2 бали = 26–50% позитивних клітин, 3 бали = 51–75% клітин, 4 бали = 76–100% клітин з імунопозитивними ядрами. Нуль та 1 бал ядерної експресії Ki-67 відповідав низькому рівню проліферативної активності клітин, 2 та 3 бали ядерної експресії Ki-67 визначали помірний рівень проліферації клітин, а експресія Ki-67 в 4 бали відповідала високому рівню клітинної проліферації. Рівень цитоплазматичної (інколи й ядерної) експресії каспази-3 розцінювали як слабкий при наявності 0–33% імунопозитивних пухлинних клітин, як помірний – при наявності 34–66% імунопозитивних клітин і як виразний – при наявності 67–100% імунопозитивних клітин. Низький рівень експресії p53 реєстрували при наявності <10% пухлинних клітин з імунопозитивними ядрами, високий рівень – при наявності 11–29% імунопозитивних клітин, а про гіперекспресію цього маркера свідчила наявність $\geq 30\%$ імунопозитивних пухлинних клітин (Jian-Liu et. al., 2004).

Відносні площі, займані Her Par-1-, AFP-, CK7-, CK20-, Ki-67-, каспаза-3-, p53-імунопозитивними клітинами в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку, визначали у відсотках методом цифрової морфометрії в стандартизованій площі гістологічного зрізу (СПГЗ) цих пухлин [30]. Стандартизованою площею гістологічного зрізу ГЦР і ХЦР 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 стандартизованих цифрових імуногістохімічних зображеннях ГЦР та ХЦР печінки, в програмі Image J визначали відносну площу експресії імунопозитивних клітин, яка являла собою відсоткове співвідношення числа пікселів відповідних імунопозитивних клітин до загального числа пікселів у цифровому ІГХ зображенні ГЦР або ХЦР печінки.

Інвазивні властивості ГЦР і ХЦР вивчали з урахуванням рівнів експресії матричної металопротеїнази 9 (ММР-9) і її тканинного інгібітора

TIMP-1, β -катеніну і E-кадгерину, а також з урахуванням площ імуноцитивних клітин в цих пухлинах. Експресію MMP-9 в пухлинних клітинах печінки визначали з використанням поліклональних антитіл *Rb a-Hu MMP-9 (92kDa Collagenase IV)* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), а експресію її тканинного інгібітора TIMP-1 визначали моноклональними антитілами *Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2 (Clone 102D1, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США)*. Експресію β -катеніну та E-кадгерину визначали за допомогою моноклональних антитіл *Mo a-Hu E-Cadherin (Clone NCH-38, «DAKO», США)* та *Mo a Hu Beta-Catenin (Clone E247 β -Catenin-1, «DAKO», США)*.

Рівні експресії MMP-9, TIMP-1, β -катеніну та E-кадгерину кількісно градували в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ) на 4 рівня методом фотоцифрової морфометрії, описаним вище. Площі MMP-9-, TIMP-1-, β -катенін-, E-кадгерин-імуноцитивних клітин в ГЦР і ХЦР печінки морфометрично вимірювали у відсотках в СПГЗ цифрових ІГХ зображень цих пухлин з використанням програми Image J описаним вище методом.

Для визначення особливостей фіброзного ГЦР у 16 хворих на ГЦР з фіброзом строми, у 7 хворих на ГЦР з циротичними змінами в пухлині, а також у 3 хворих на фіброламельярний ГЦР виконані ІГХ дослідження експресії HerPar-1, AFP, MUC1, СК 7, 8, 19, 20. У 2 хворих комбінованим гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярним раком додатково вивчалася експресія в пухлині S100, TTF-1, CDX2.

Для диференційної діагностики первинного раку печінки і метастазів в печінку інших злоякісних пухлин невстановленої первинної локалізації спочатку застосовувалась скринінгова ІГХ панель з 4-х антитіл (пан-цитокератин, загальний лейкоцитарний антиген, віментин, S100), а потім для пан-цитокератин-позитивних та S100-позитивних пухлин застосовували додаткові ІГХ панелі, що включали гепатоцитарні (HerPar-1, α -FTP), цитокератинові (СК7, 8, 19, 20), меланоцитарні (HMB45, тирозиназа), нейроендокринні (ChG, Syn, CD56), рецепторно-гормональні (ER,

маммаглобін, Andr, PSA), муцинозні (MUC1, MUC2) і транскрипційні (CDX2, TTF-1) маркери.

Для диференційної діагностики ГЦР та метастатичних пухлин солідно-клітинної і трабекулярної мікроструктури використана ІГХ панель з визначенням експресії гепатоцитарних (HepPar-1, α -FTP), цитокератинових (CK7, CK20), меланоцитарних (HMB45, тирозиназа), нейроендокринних (S100, ChG, Syn, CD56), рецепторно-гормональних (ER, Andr, PSA) маркерів та маммаглобіну.

Диференційна діагностика ХЦР та метастазів в печінку протокового рака ПЖ виконана в розширеній ІГХ панелі з визначенням експресії HepPar-1, AFP, СК 7,8,19,20, а також експресії MUC1, MUC5AC, CA125, CA19-9.

Для диференційної діагностики між ХЦР і метастатичними пухлинами тубулярної і залозисто-ацинарної структури використана ІГХ панель з таких маркерів як HepPar-1, α -FTP, CK7, CK20, CDX2, CA 19-9, CA 125, MUC1, MUC2, MUC5AC, TTF-1.

При порівняльному ІГХ аналізі первинного і метастатичного раку печінки пухлинні клітини у обраних диференційних ІГХ панелях маркували з використанням моноклональних антитіл *Mo a-Hu Melanosome* (Clone HMB45, «ДАКО», США); *Mo a-Hu Tyrosinase* (Clone T311, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu S100 Protein* (Clone 4c4.9, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu Synaptophysin* (Clone SY38, «ДАКО», США); *Mo a-Hu CD56* (Clone T199, «ДАКО», США); *Rb a-Hu Estrogen Receptor Alpha* (Clone SP1, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu Mammaglobin* (Clone 304-1A5, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu PSA* (Clone ER-PR8, «ДАКО», США); *Mo a-Hu CDX2* (Clone DAK-CKX2, «ДАКО», США); *Mo a-Hu CA 125* (Clone M11, «ДАКО», США), *Mo a-Hu CA 19-9* (Clone C241:5:1: 4, «DBS», США); *Rb a-Hu MUC1* (Clone S.854.6, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu MUC2* (Clone M53, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu MUC5AC* (Clone 45M1, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu TTF-1* (Clone 8G7G3/1, «Thermo Fisher Scientific Inc.»),

США), *Mo a-Hu CD34* (Clone QBEnd/10, «Thermo Fisher Scientific Inc.»), США), *Mo a-Hu Cytokeratine 19* (Clone RSK 108, «DAKO», США), поліклональних антитіл *Rb a-Hu Cytokeratine 8* (Clone EP1628Y, «Thermo Fisher Scientific Inc.»), США), *Rb a-Hu Androgen Receptor* («Thermo Fisher Scientific Inc.»), США) і *Rb a-Hu Chromogranin A* («DAKO», США).

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 $p < 0,05$. Значення коефіцієнта кореляції Пірсона r від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак; значення r від 0,3 до 0,69 підтверджувало середній ступінь зв'язку ознак; значення r від 0,7 і вище свідчило про наявність сильного зв'язку між ознаками, що вивчалися.

РОЗДІЛ 3

МІКРОСКОПІЧНА І ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РАКУ ПЕЧІНКИ

Патоморфологічні дослідження біоптатів печінки хворих показали, що важливою морфологічною особливістю гепатоцелюлярного раку є значна варіабельність мікроструктури різних ділянок пухлини у одного й того ж пацієнта, яка проявляється наявністю ділянок пухлинних клітин, що нагадують гепатоцити, а також ділянок пухлинних клітин, що значно відрізняються від гепатоцитів і не утворюють типових печінкових структур. Для запобігання діагностичних помилок при дослідженні печінкового трепанобіоптату, в який попадає обмежена кількість пухлинного матеріалу, необхідно не тільки враховувати цю особливість мікроскопічної будови гепатоцелюлярного раку, але й застосовувати мінімальну імуногістохімічну диференційно-діагностичну панель для виявлення в пухлинних клітинах антигенів, найбільш характерних для гепатоцелюлярного раку.

3.1 Мікроскопічна характеристика гепатоцелюлярного раку

При мікроскопії клітини гепатоцелюлярного раку поліморфні (мають овальну або неправильну геометричну форму), дрібніші або навпаки - більші, ніж нормальні гепатоцити. В одних зонах раку пухлинні клітини мають щільну еозинofilьну цитоплазму і відносно велике овальне базофільне ядро з щільним хроматином, в якому майже не диференціюється велике щільне ядрце; в інших зонах пухлинні клітини мають бліду, базофільну або прозору цитоплазму, а також неупорядкованої форми ядро з розрідженим, блідим хроматином та з 2-ма або кількома ядрцями. Кількість клітин з фігурами мітозу та апоптотичних клітин варіює від невеликої до значної (Рис.3.2, 3.2).

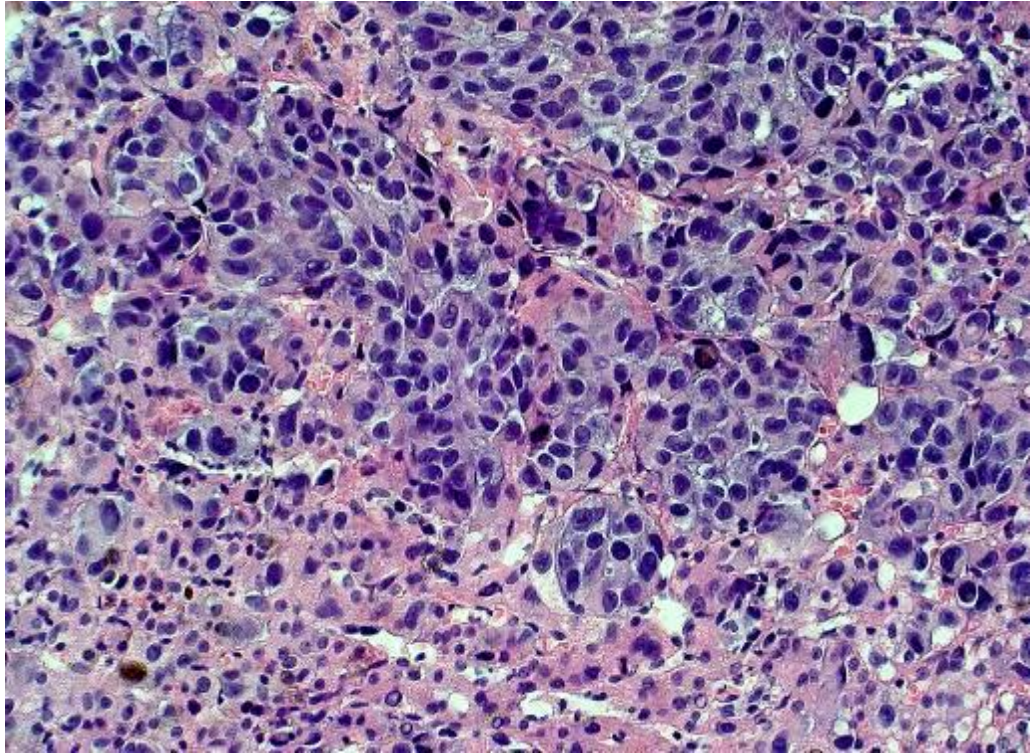


Рис. 3.1 Базофільні клітини гепатоцелюлярного раку з інвазією прилеглої тканини печінки. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

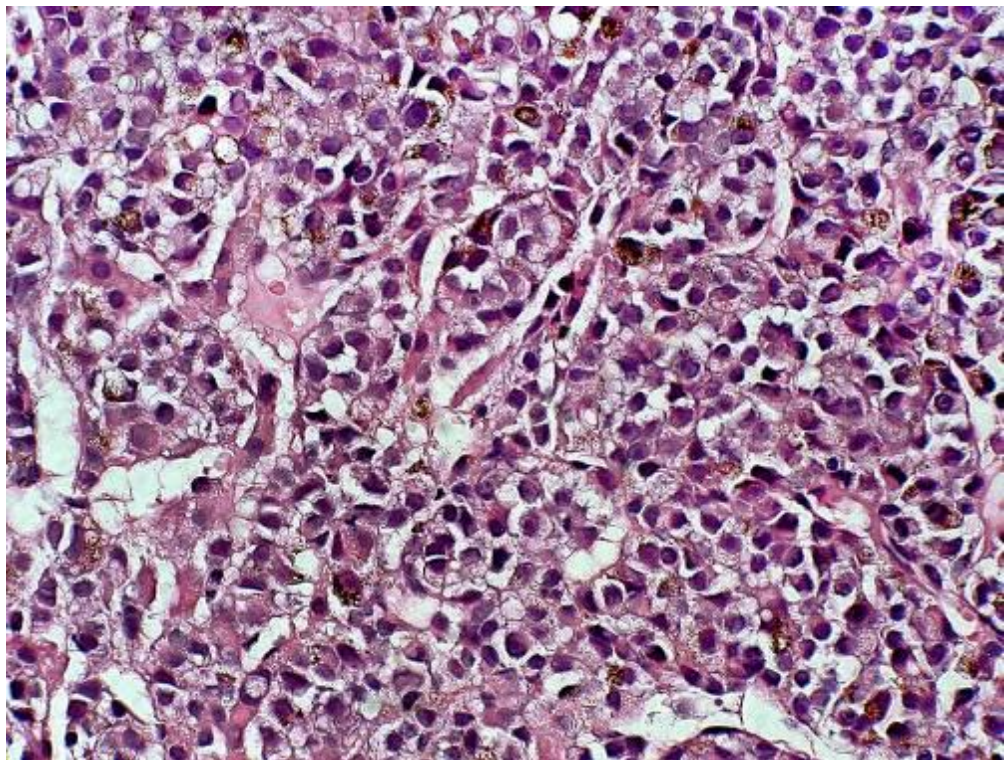


Рис. 3.2 Еозинофільні клітини гепатоцелюлярного раку з внутрішньоклітинними холестазами. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

Рідко в цитоплазмі пухлинних клітин виявляються внутрішньоклітинні холестази, тільця Маллорі, в окремих випадках – скупчення фібриногену та гранули альфа1-антитрипсину. Клітини утворюють чотирьох або багатоклітинні трабекули і скупчення, між якими розташовуються атипові синусоїди, вистелені сплосченим ендотелієм. У тканині пухлини виявляються жовчні капіляри, відсутні клітини Купфера, можуть визначатися ділянки некрозу, дрібновогнищеві крововиливи. При мікроскопії в трепанобіоптатах печінки спостерігається інвазивний зріст гепатоцелюлярного раку в перифокальну тканину, характерна для пухлини інвазія в венозні судини в дрібних стовпчиках трепанобіоптатів, як правило, не виявлялась.

Проведені нами дослідження показали, що при мікроскопії в гепатоцелюлярній карциномі виявляється декілька гістоархітектонічних структурних регіонів чи патернів: ацинарний (або псевдозалозистий), трабекулярний, солідно-клітинний (або компактний), фіброзно-, цирротичний, які не мають впорядкованого розташування в пухлині і не мають певної клінічної симптоматики. Слід зазначити, що в трепанобіоптат з малим об'ємом пухлинної тканини не завжди попадають всі патерни гепатоцелюлярного раку, може визначатися тільки один, або два чи три патерни пухлини. При мікроскопії трепанобіоптатів печінки в ГЦР частіше за все виявлялися трабекулярний, ацинарний і солідно-клітинний патерни.

Трабекулярний патерн гепатоцелюлярного раку при мікроскопії представляв собою переплетіння своєрідних трабекул з чотирьох-восьми рядів поліморфних пухлинних гепатоцитів, розділених розширеними синусоїдоподібними просторами, вистеленими сплосченими ендотеліальними клітинами (Рис.3.3). В трабекулах подекуди виявлялися жовчні капіляри і канальці, але були відсутні клітини Купфера.

Ацинарний патерн гепатоцелюлярного раку формували значно розширені жовчні канальці з білковоподібним, еозинофільним, ШИК-позитивним матеріалом, навколо яких розташовувалися пухлинні атипові гепатоцити (Рис.3.4).

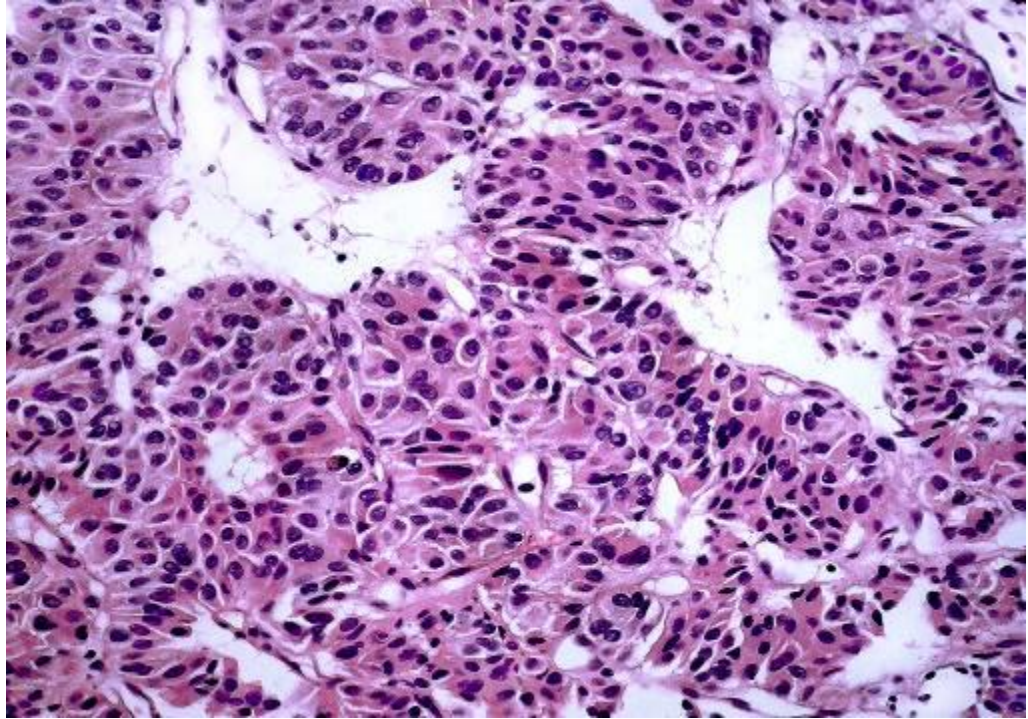


Рис. 3.3 Трабекулярний патерн гепатоцелюлярного раку. Збарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

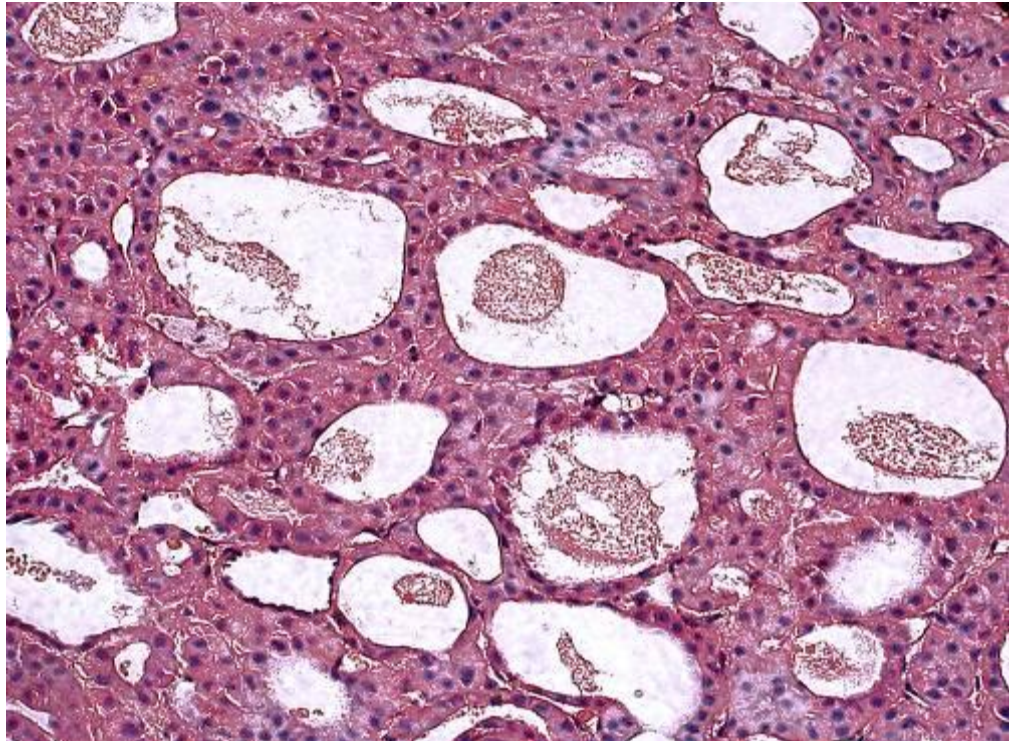


Рис. 3.4 Ацинарний патерн гепатоцелюлярного раку. Збарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 350.

Солідно-клітинний патерн гепатоцелюлярного раку представляє собою поширені ділянки атипових пухлинних гепатоцитів з вузькими, сплющеними і ледь помітними синусоїдами поміж ними, кордони між трабекулами втрачені (рис.3.5). В такому патерні, як правило, локалізовані поліморфні пухлинні гепатоцити з поліморфними гіперхромними ядрами.

Різновидом солідно-клітинного патерну гепатоцелюлярного раку є так званий гніздно-клітинний патерн, в якому визначаються скупчення пухлинних клітин з наявністю поміж ними прошарків фіброзу різної конфігурації і довжини (Рис.3.6). В скупченнях атипових пухлинних клітин відсутні клітини Купфера, подекуди виявляються жовчні каналці.

Наявність значних прошарків фіброзу різної конфігурації, товщини і довжини поміж скупченнями і рядами пухлинних клітин дає підставу діагностувати в трепанобіоптаті печінки з обмеженою кількістю пухлинного матеріалу так званий фіброзний варіант гепатоцелюлярного раку (рис.3.7). Сполучнотканинні прошарки різної конфігурації і довжини, найбільш ймовірно, являють собою фіброзну строму гепатоцелюлярного раку, розташовану поміж скупченнями пухлинних клітин, які оточені ледь помітними, атиповими, сплющеними пухлинними синусоїдами, вистеленими малочисленими ендотеліальними клітинами.

Циротичний гепатоцелюлярний рак відрізняється надмірним розвитком в пухлині фіброзної стромы, яка нерідко переважає над раковими клітинами. За мікроскопічною будовою в трепанобіоптатах пухлини розрізняються два варіанта циротичного гепатоцелюлярного раку. При одному з них в пухлині виявляються неправильної форми гнізді скупчення атипових пухлинних гепатоцитів, які оточені надмірно розвинутими прошарками сполучної тканини різної конфігурації і протяжності з наявністю в них різної кількості колагенових волокон та лімфоцитів (рис.3.8).

При другому варіанті циротичного гепатоцелюлярного раку пухлинні клітини формують рясні ацинарні і трабекулярні структури у вигляді неправильної форми острівців, між якими визначаються надто широкі

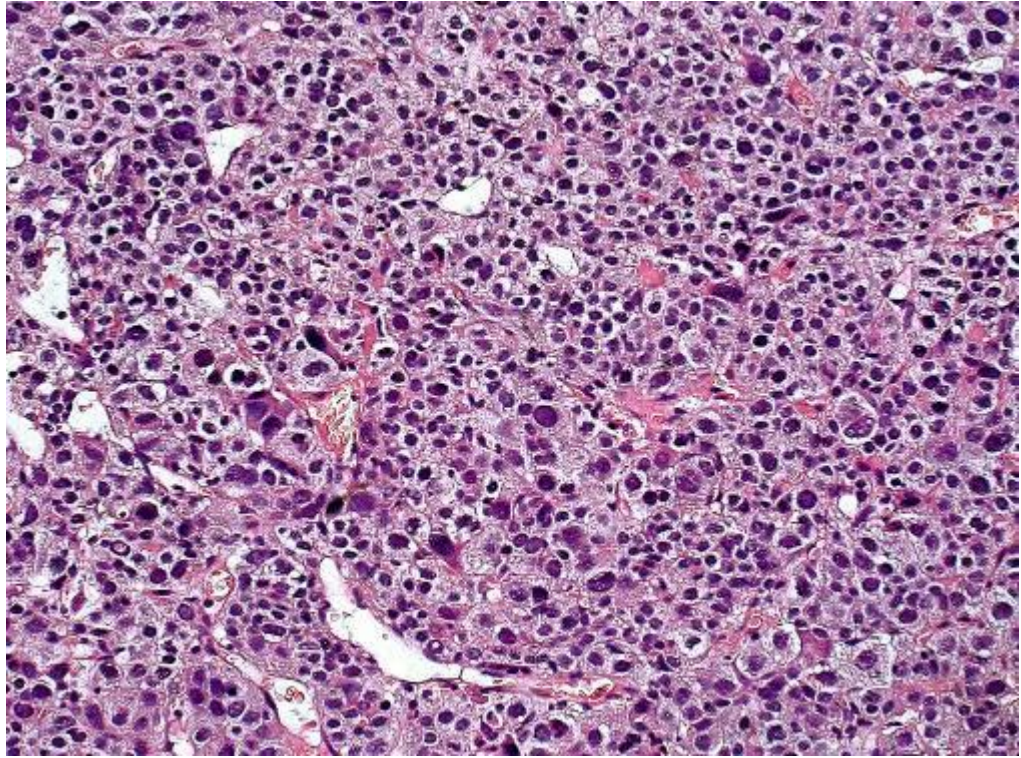


Рис. 3.5 Солідно-клітинний патерн гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 350.

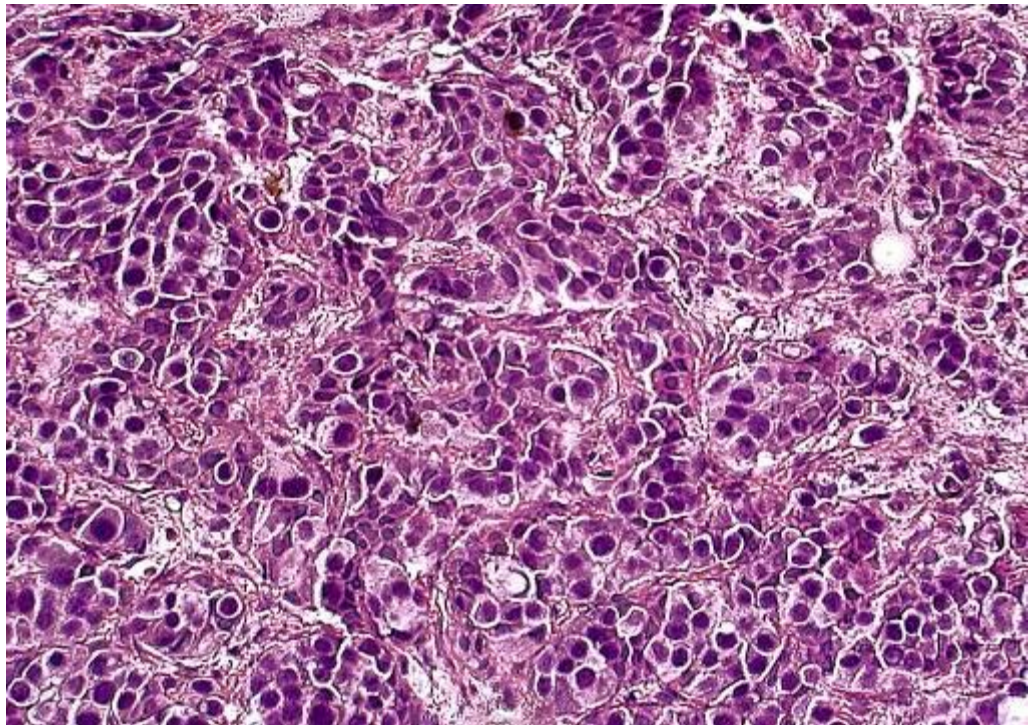


Рис. 3.6 Гніздно-клітинний патерн гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

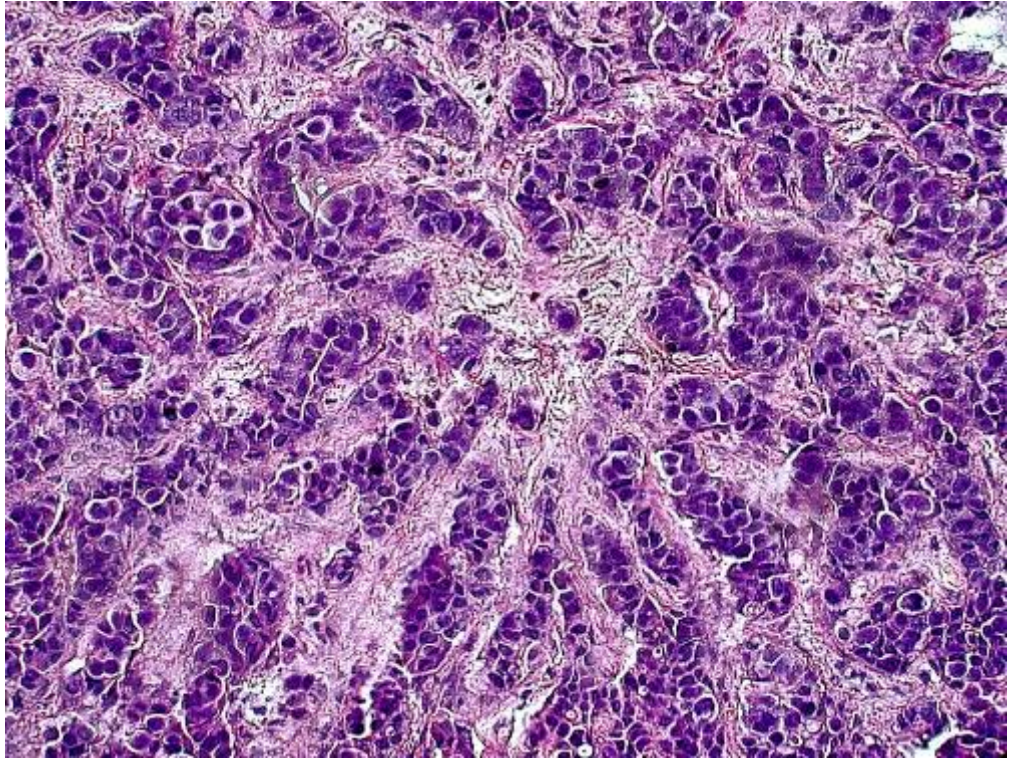


Рис. 3.7 Фіброзний варіант гепатоцелюлярного раку. Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

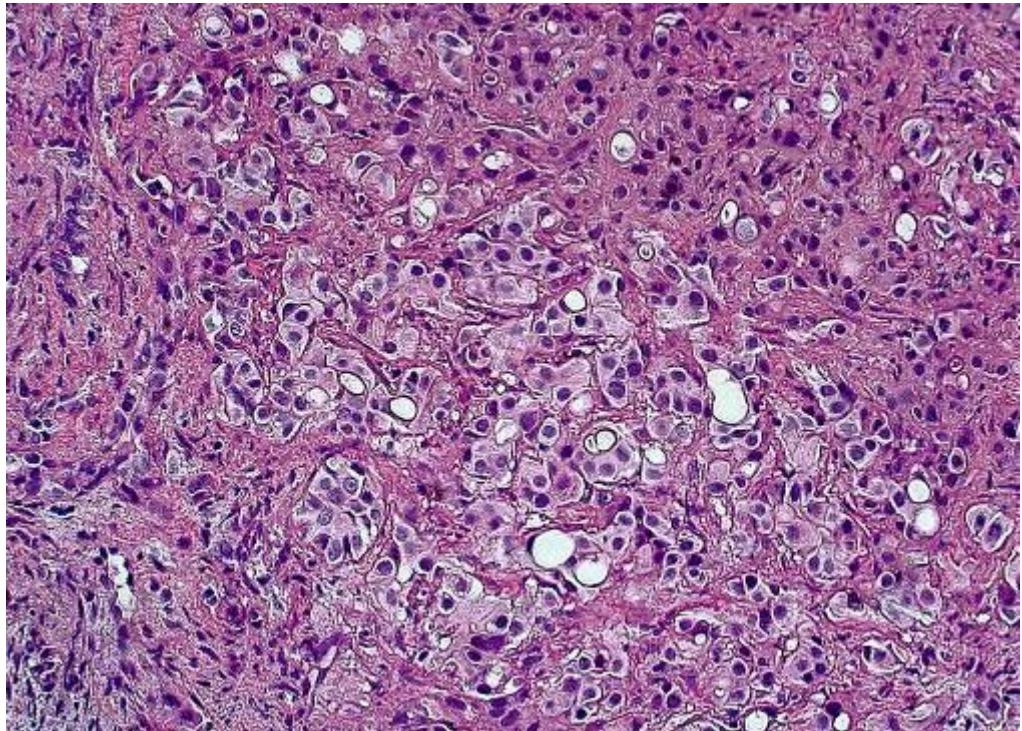


Рис. 3.8 Циротичний варіант гепатоцелюлярного раку з гніздними скупченнями пухлинних гепатоцитів. Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

прошарки сполучної тканини різної геометричної конфігурації з наявністю в них різної кількості фіброblastів та колагенових волокон (Рис.3.9).

В скірозному варіанті гепатоцелюлярного раку сполучнотканинна строма в десятки разів перевищує мінімальну кількість пухлинних атипових гепатоцитів, що утворюють одно-двохклітинні ланцюги всередині синусоїдів, вистелених малочисленим сплощеним ендотелієм (Рис.3.10). В трепанобіоптатах печінки такий варіант ГЦР відрізняється від скірозного варіанту ХЦР тим, що в атипових гепатоцитах ГЦР виявляється слабка експресія гепатоцитарного маркера HerPar-1, а в ледь помітних синусоїдах навколо них виявляються CD31 і CD34 позитивні ендотеліальні клітини.

Слід відзначити, що фіброзно-циротичний і скірозний варіанти гепатоцелюлярного раку не пов'язані з цирозом печінки, на тлі якого, частіше за все, виникає вузловий гепатоцелюлярний рак з наявністю трабекулярних, солідноклітинних і ацинарних патернів. За нашими даними гепатоцелюлярний рак відокремлюється від циротичнозміненої печінки значним прошарком сполучної тканини з наявністю в ній недиференційованих клітин, які формують тонкі трабекулярні і дуктулоподібні структури, що поступово трансформуються у вище зазначені патерни ракової пухлини (рис.11 А,Б,В,Г).

За мікроструктурою пухлинних клітин виділяється поліморфноклітинний (Рис.3.12), везикулярно-клітинний, веретенноклітинний, світлоклітинний і гігантоклітинний варіанти пухлини (Рис.3.13 А,Б).

У високодиференційованому гепатоцелюлярному раку виявляються класичні солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни. Помірнодиференційований гепатоцелюлярний рак представлений фіброзним і циротичним варіантами пухлини. Низькодиференційований і недиференційований гепатоцелюлярний рак визначають скірозні, веретенноклітинні, поліморфноклітинні і гігантоклітинні варіанти пухлин, трабекулярні і ацинарні структури відсутні.

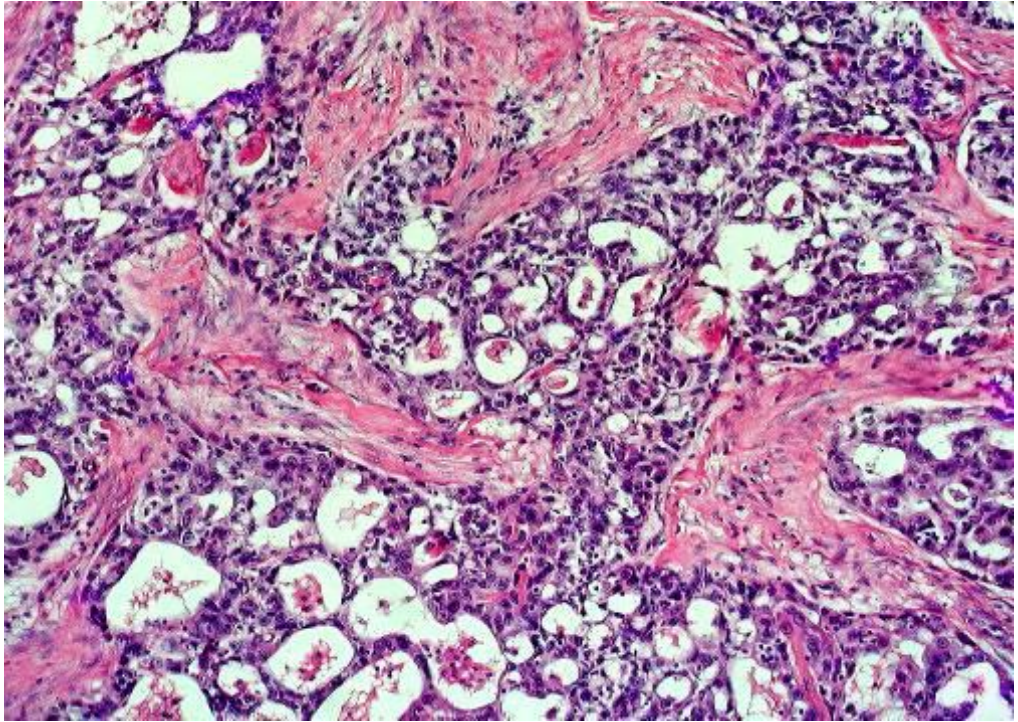


Рис. 3.9 Циротичний варіант гепатоцелюлярного раку з широкими прошарками сполучної тканини між рясними ацинарними і трабекулярними структурами. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200.

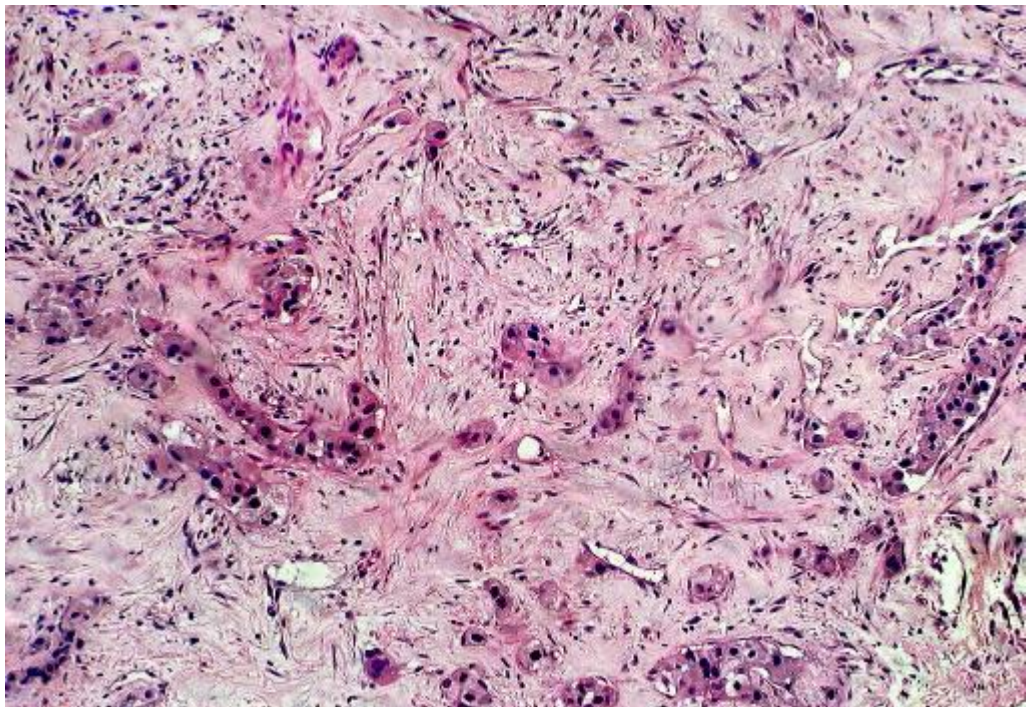


Рис. 3.10 Скірозний варіант гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

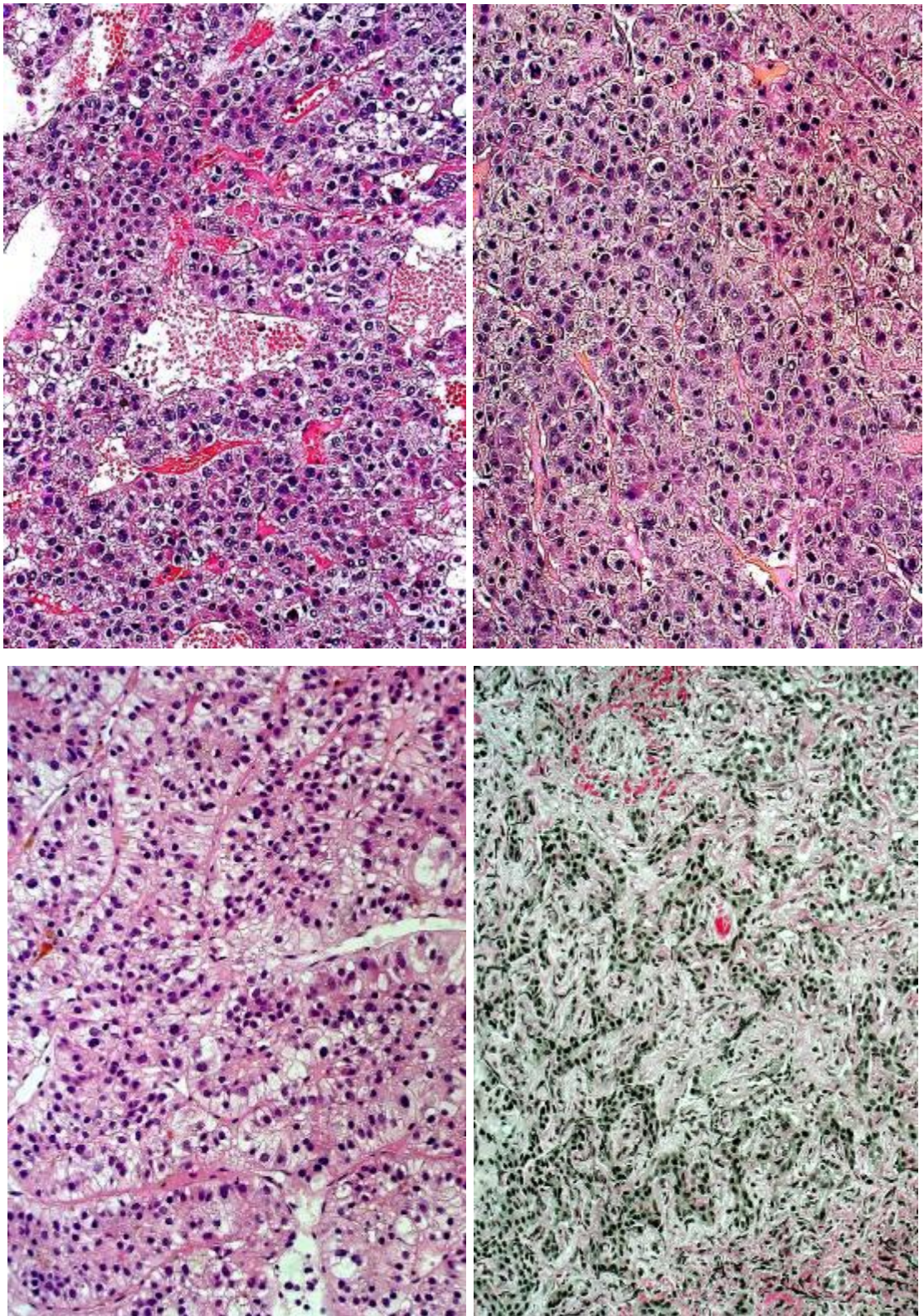


Рис. 3.11 А,Б,В,Г. Гепатоцелюлярний рак на тлі цирозу печінки з наявністю ацинарних (А), солідноклітинних (Б) і трабекулярних (В) патернів. Тонкі трабекулярні і дуктулоподібні структури з недиференційованих клітин в сполучній тканині на межі з тканиною печінки (Г). Забарвлення: А,Б,В - гематоксилином і еозином; Г – за Ван Гізон. Зб.: А,Б,В,Г x 200.

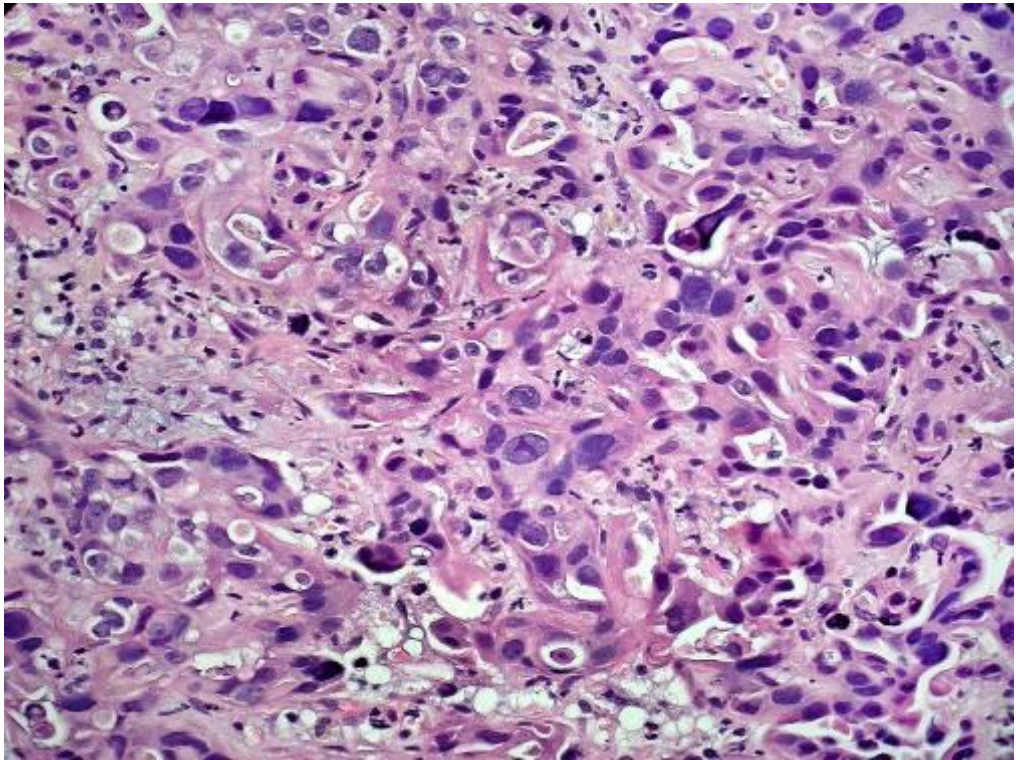


Рис. 3.12 Поліморфноклітинний варіант гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

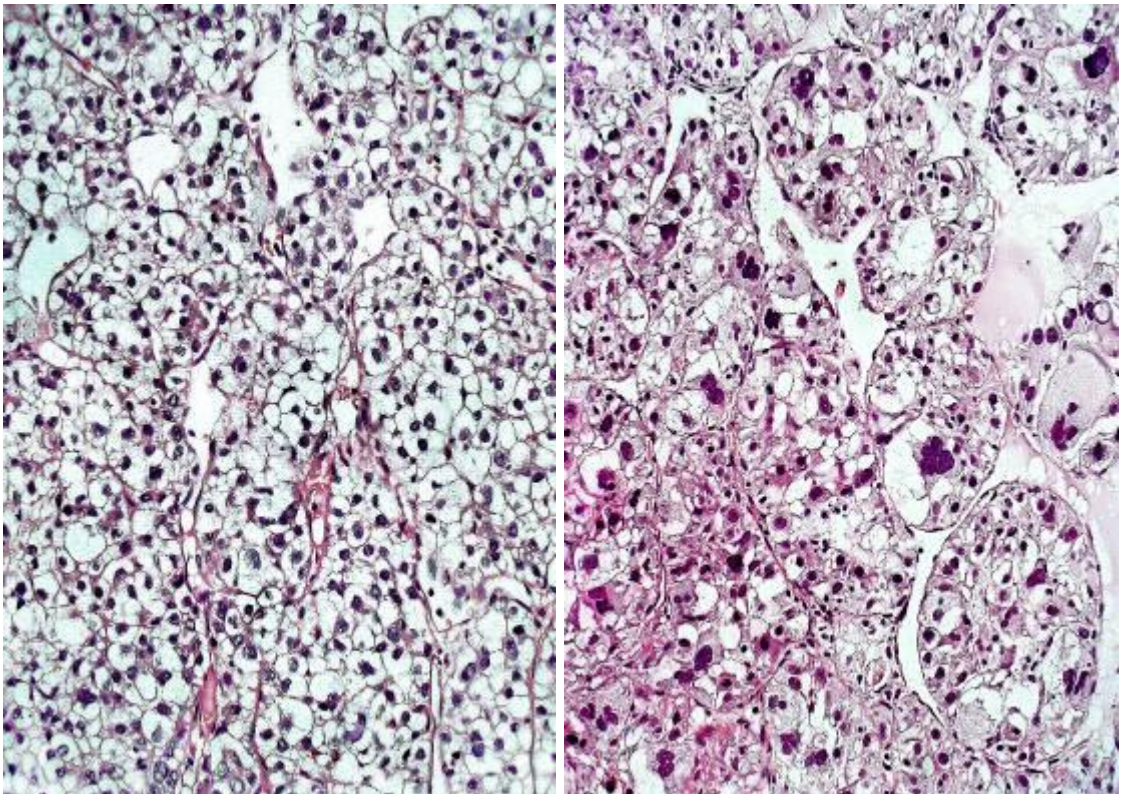


Рис. 3.13 А,Б. Світлоклітинний (А) і гігантклітинний (Б) варіанти гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

Особливе положення займає фіброламельярний варіант гепатоцелюлярного раку. Основу такого раку становлять великі полігональні пухлинні гепатоцити з широкою, просвітленою або еозинофільною зернистою цитоплазмою і великим просвітленим ядром з відносно великими ядерцями. Великі пухлинні клітини утворюють поширені скупчення або гнізда з ландкартоподібними, неправильної геометричної форми зовнішніми контурами (Рис.3.14). У цитоплазмі деяких пухлинних клітин інколи визначаються своєрідні крупні гіалінові тільця та дрібні гранули жовчних пігментів. Фігури мітозу дуже рідкі.

Гнізда пухлинних клітин оточені атиповими щілиноподібними синусоїдними просторами, вистеленими сплющеними ендотеліальними клітинами з вузькими ядрами. Поміж поширеними скупченнями та гніздами пухлинних клітин розташовані широкі пластинчасті тяжі і прошарки сполучної тканини з наявністю значної кількості фібробластів, колагенових волокон і артеріальних судин, хоча пухлина зазвичай не взаємопов'язана з цирозом печінки. Колагенові волокна утворюють паралельні подовжені тяжі – так звані ламели. В певних місцях пухлини волокнистий компонент сполучнотканинних прошарків має вигляд вогнищ безклітинного або малоклітинного гіалінозу. Сполучнотканинний компонент фіброламельярного гепатоцелюлярного раку виразно виявляється при забарвленні мікропрепаратів за Ван Гізон (Рис. 3.15) та трикольоровим методом Масона.

Аналіз 10 випадків гепатоцелюлярного раку, асоційованого з цирозом печінки у хворих на ХВГ В або С, показав відсутність мікроскопічних аналогій такого раку з солідно-фіброзним, циротичним, скірозним або фіброламельярним варіантами первинного гепатоцелюлярного раку. Рак у хворих на цироз печінки вірусного генезу має будову монофокального пухлинного вузла або мультифокальних вузлів ацинарної, солідноклітинної і трабекулярної структури. Гепатоцелюлярний рак не розповсюджується поміж сполучнотканинними прошарками цирозу печінки прошарками, нерідко має зовнішню фіброзну капсулу.

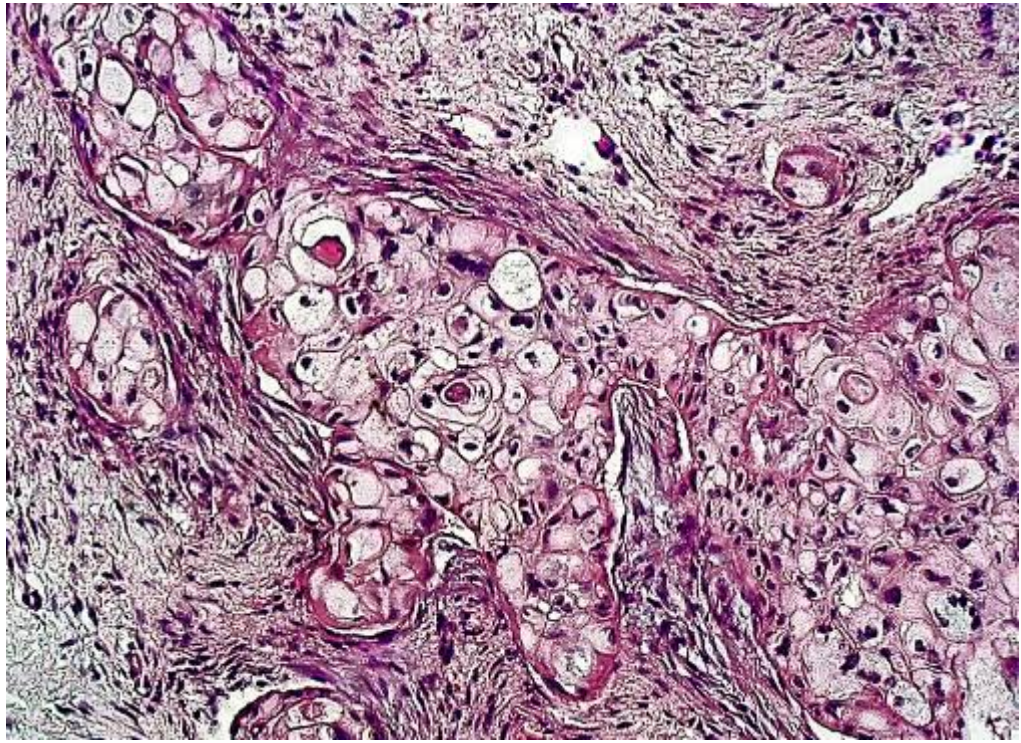


Рис. 3.14 Фіброламелярний варіант гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

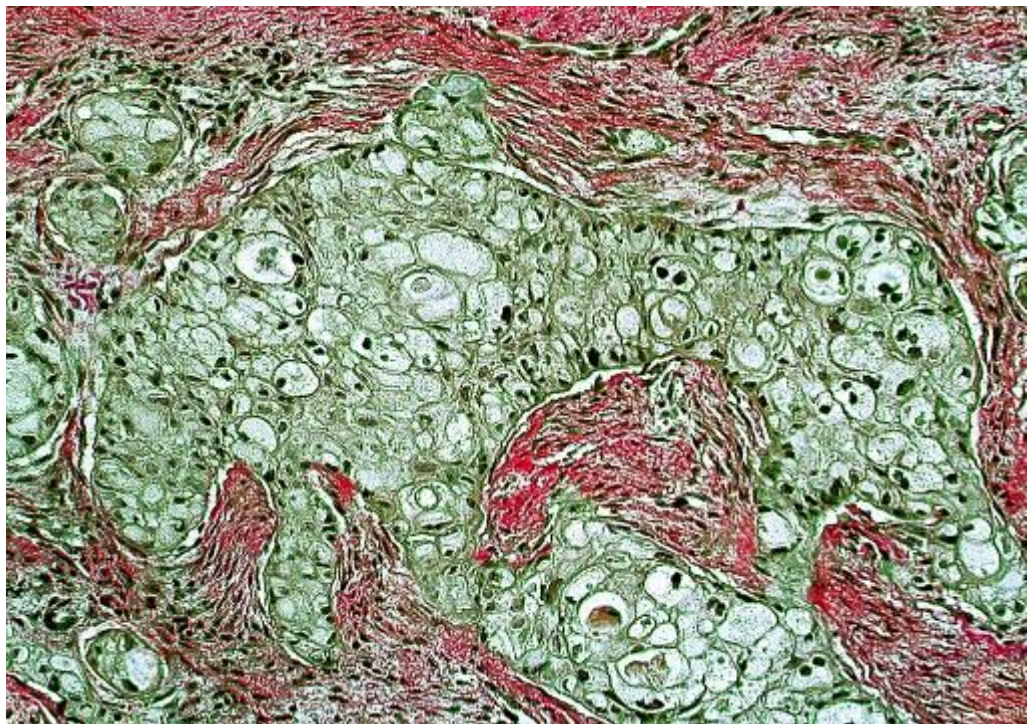


Рис. 3.15 Фіброламелярний варіант гепатоцелюлярного раку. Забарвлення за Ван Гізон. Зб. х 400.

Комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак печінки є рідкісною формою первинного раку печінки, який в нашому матеріалі склав 1,6% усіх випадків діагностованого раку печінки. В наших спостереженнях в одному випадку діагностовано вузлову форму комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний раку, в якому гепатоцелюлярний рак був відокремлений товстою фіброзною капсулою від холангіоцелюлярного раку в фібропластичній стромі. В скринінговий первинний трепанобіоптат пухлини печінки попав тільки тубулярний компонент холангіоцелюлярного раку (рис. 3.16), в якому в рясній фібропластичній стромі виявлялися протокоподібні структури, вистелені сплосченими холагіоцитарними СК7-імунопозитивними пухлинними клітинами. Діагностична трепанобіопсія пухлини ускладнилася масивною кровотечею. Гепатоцелюлярний компонент цього раку був ідентифікований в секційному матеріалі: в печінці був виявлений трабекулярно-солідний патерн гепатоцелюлярного раку, відокремлений широкою сполучнотканинною капсулою від здорової тканини печінки і від тубулярного холангіоцелюлярного раку в фібропластичній стромі (рис. 3.17).

В другому випадку комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак с самого початку мав мультифокальний зріст в обох долях печінки. В трепанобіоптаті печінки кубоподібні і поліморфні еозинофільні пухлинні клітини формували солідно-клітинні і трабекулярні патерни гепатоцелюлярного раку, які чередувалися з широкими полями рясної фібропластичної стромі з наявністю в ній дуктулярно-ацинарних комплексів холангіоцелюлярного раку і лімфоцитарних інфільтратів. Поряд з ними визначалась тканина печінки, відокремлена від пухлини прошарками сполучної тканини. Пухлина характеризувалася швидким прогресуванням зі смертю хворої через 6 місяців з моменту діагностики комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку комп'ютерною томографією та патоморфологічним дослідженням трепанобіоптату печінки.

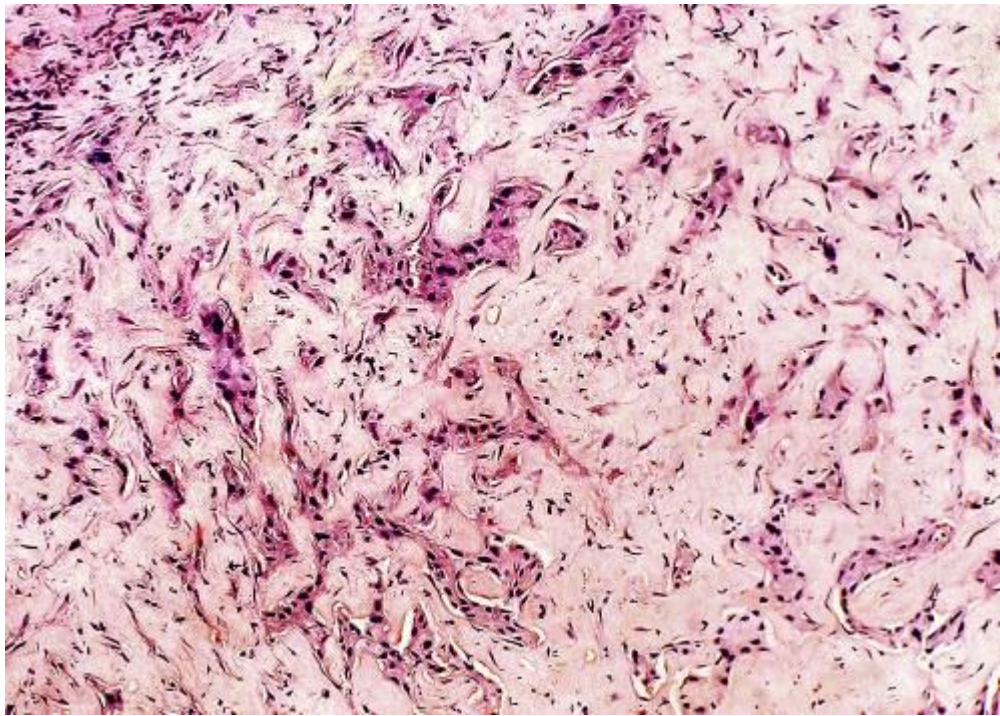


Рис. 3.16 Дуктулярні холангіоцелюлярні структури комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку печінки в трепанобіоптаті пухлини. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

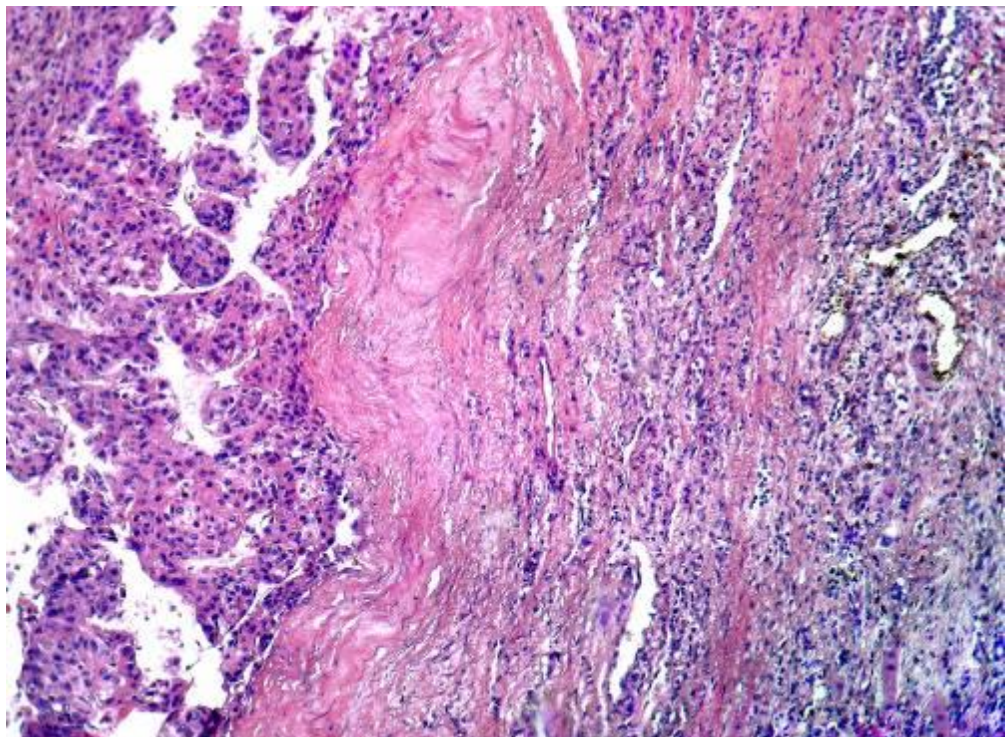


Рис. 3.17 Трабекулярний патерн гепатоцелюлярного раку (зліва), відокремлений фіброзною капсулою, комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку в секційному матеріалі печінки. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400.

3.2 Імуногістохімічна характеристика гепатоцелюлярного раку і комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку

Імуногістохімічні особливості гепатоцелюлярного раку вивчені шляхом визначення особливостей експресії його клітинами таких маркерів як HerPar-1, AFP, CK7, CK20, HBsAg і HbcAg, а також визначення в мікропрепаратах площ, яку займали в зрізах пухлини відповідні імунопозитивні клітини. Ендотеліальні клітини атипових синусоїд визначали за експресією ними CD34, в фіброламельярній карциномі визначали експресію MUC1 (EMA), в комбінованому гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярному раку – експресію CK19, S100, TTF-1, CDX2.

Виконані нами імуногістохімічні дослідження показали, що інтенсивна гранулярна експресія HerPar-1-антигену визначається в цитоплазмі нормальних (диференційованих) гепатоцитів поза межами гепатоцелюлярного раку печінки, при цьому гранулярна експресія HerPar-1 дифузно розповсюджена в цитоплазмі нормальних гепатоцитів (рис. 3.18). Встановлено, що гранулярна експресія HerPar-1-антигену виявляється також в цитоплазмі клітин гепатоцелюлярного раку печінки у 92,45% хворих, у 7,55% хворих на гепатоцелюлярний рак печінки експресія HerPar-1 пухлинними клітинами була негативною. При цьому у 54,72% пацієнтів визначається високий рівень цитоплазматичної гранулярної експресії HerPar-1 практично всіма клітинами гепатоцелюлярного раку, який склав $131,08 \pm 27,51$ УООЩ (рис. 3.19); у 22,64% хворих - помірний рівень експресії цього маркера пухлинними клітинами, що склав $79,52 \pm 14,68$ УООЩ; у 15,09% пацієнтів виявляється низький рівень експресії HerPar-1 клітинами гепатоцелюлярного раку печінки, що склав $43,32 \pm 6,71$ УООЩ; у 7,55% хворих рівень експресії HerPar-1 в пухлині склав $14,77 \pm 4,71$ УООЩ і був оцінений як негативний.

Слід зазначити неоднорідність розподілу в різних патернах гепатоцелюлярного раку печінки HerPar-1-позитивних пухлинних клітин.

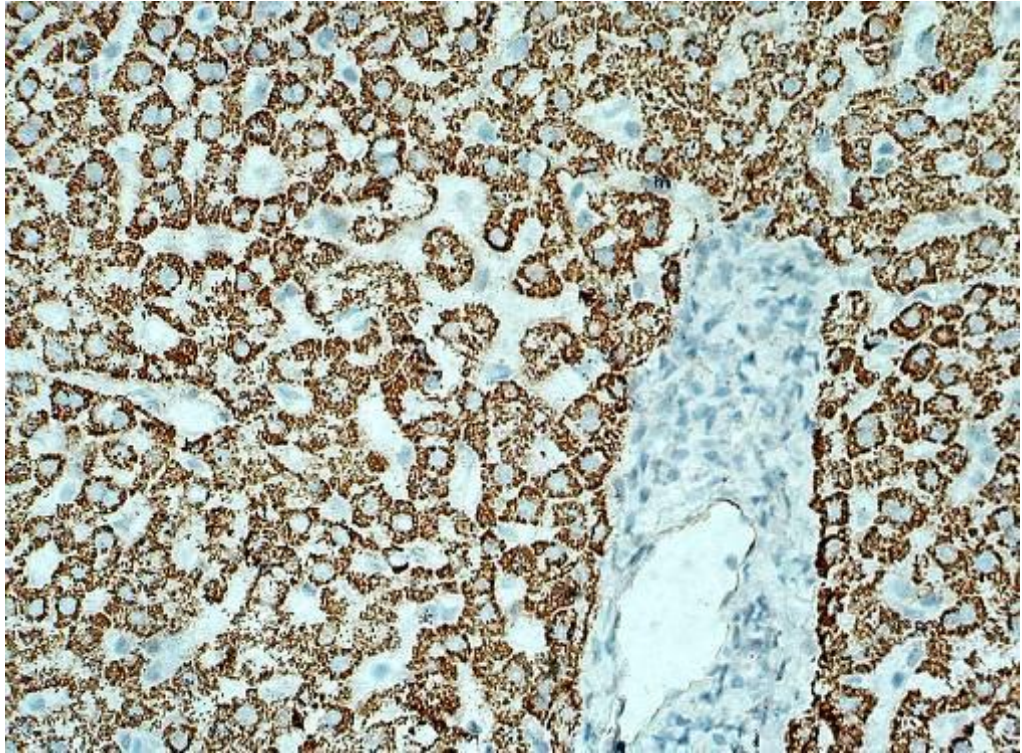


Рис. 3.18 Інтенсивна гранулярна цитоплазматична експресія HepPar-1 в гепатоцитах поза межами гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Hepatocyte, Clone OCH1E5*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x650

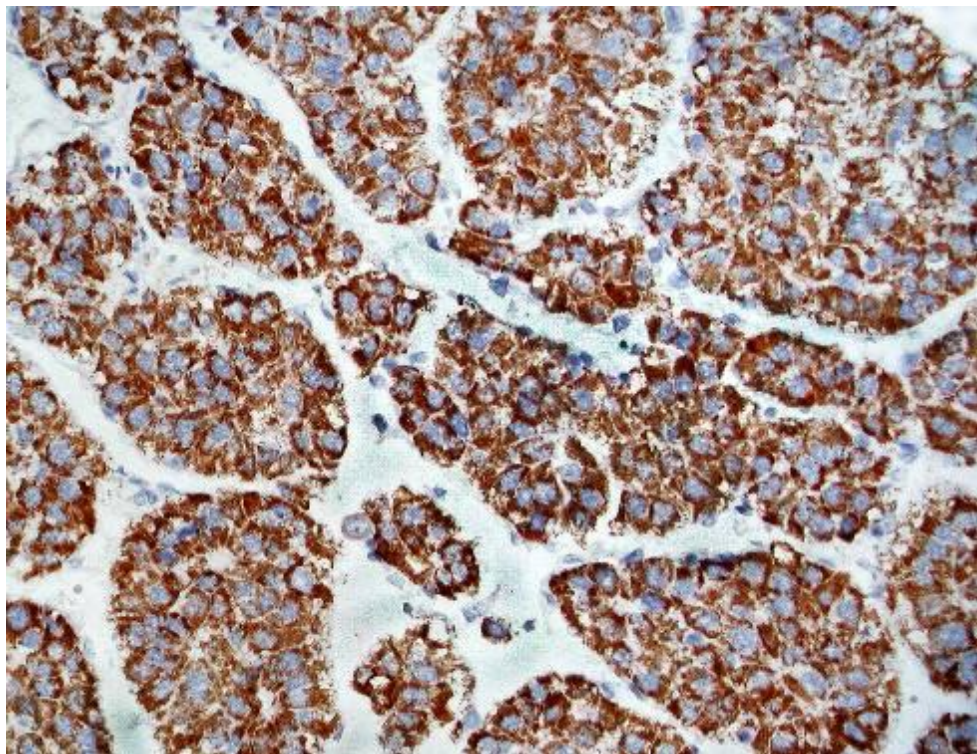


Рис. 3.19 Високий рівень гранулярної цитоплазматичної експресії HepPar-1 практично всіма клітинами гепатоцелюлярного раку HepPar-1. *Mo a-Hu Hepatocyte, Clone OCH1E5*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x400

У соліднооклітинному патерні гепатоцелюлярного раку великі вогнища іммунопозитивних клітин з високою цитоплазматичною експресією HerPar-1 змінюються дрібними вогнищами іммунонегативних клітин та вогнищами пухлинних клітин з різним рівнем цитоплазматичної експресії HerPar-1, якій варіював від високого до вкрай низького (рис.3.20). У трабекулярному патерні пухлини між іммунонегативними клітинами розташовуються групи HerPar-1-позитивних клітин з однаково високим рівнем експресії цього маркера в цитоплазмі (рис.3.21), або визначаються вогнищеві скупчення пухлинних клітин з різним рівнем експресії HerPar-1. З урахуванням осередкового і неоднорідного розподілу HerPar-1-позитивних клітин в гепатоцелюлярному раку важливе діагностичне значення набуває середня площа іммунопозитивних клітин у пухлині. Проведений фотоцифровий морфометричний аналіз 53 випадків гепатоцелюлярного раку показав, що площа, яку займали HerPar-1-іммунопозитивні клітини, в середньому становила $49,35 \pm 25,45\%$ СПГЗ клітин гепатоцелюлярного раку.

Нами визначено, що у 81,13% хворих ГЦР печінки в злоякісних клітинах визначається цитоплазматична і ядерна експресія α -фетопроतेїну. Рівень експресія AFP клітинами гепатоцелюлярного раку у 37,74% пацієнтів був високим (рис.3.22) і становив $122,71 \pm 21,88$ УООЩ, у 26,42% хворих був помірним та становив $71,02 \pm 13,86$ УООЩ, у 16,97% пацієнтів рівень експресії цього печінкового глікопротеїну був низьким (рис.3.23) і становив $34,62 \pm 10,51$ УООЩ, у 18,87% хворих визначена іммунонегативна реакція, при якій дуже низький рівень експресії AFP становив $8,46 \pm 3,34$ УООЩ. Виконаний ІГХ аналіз показав неоднорідність розподілу в різних патернах гепатоцелюлярного раку AFP-іммунопозитивних пухлинних клітин. Результати фотоцифрового морфометричного аналізу 53 випадків гепатоцелюлярного раку показали, що площа AFP-іммунопозитивних пухлинних клітин в середньому становила $37,25 \pm 15,47\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку печінки.

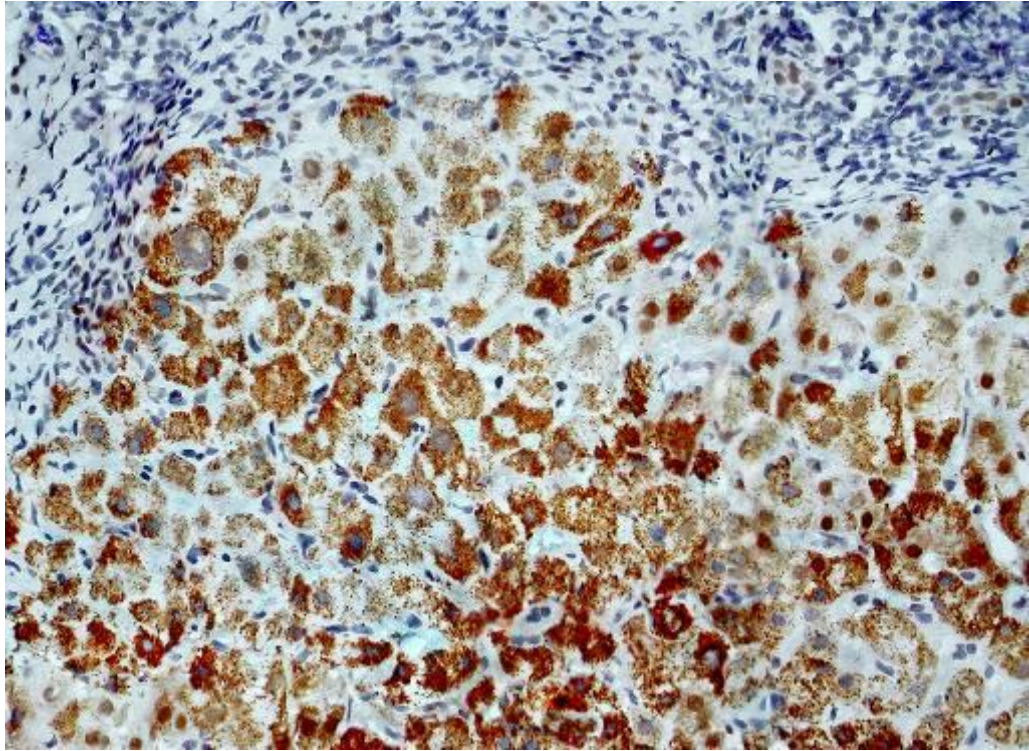


Рис. 3.20 Вогнищевий, переважно високий рівень гранулярної цитоплазматичної експресії HepPar-1 в солідноклітинному патерні гепатоцелюлярного раку. Мо *a-Hu Hepatocyte, Clone OCH1E5*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x650

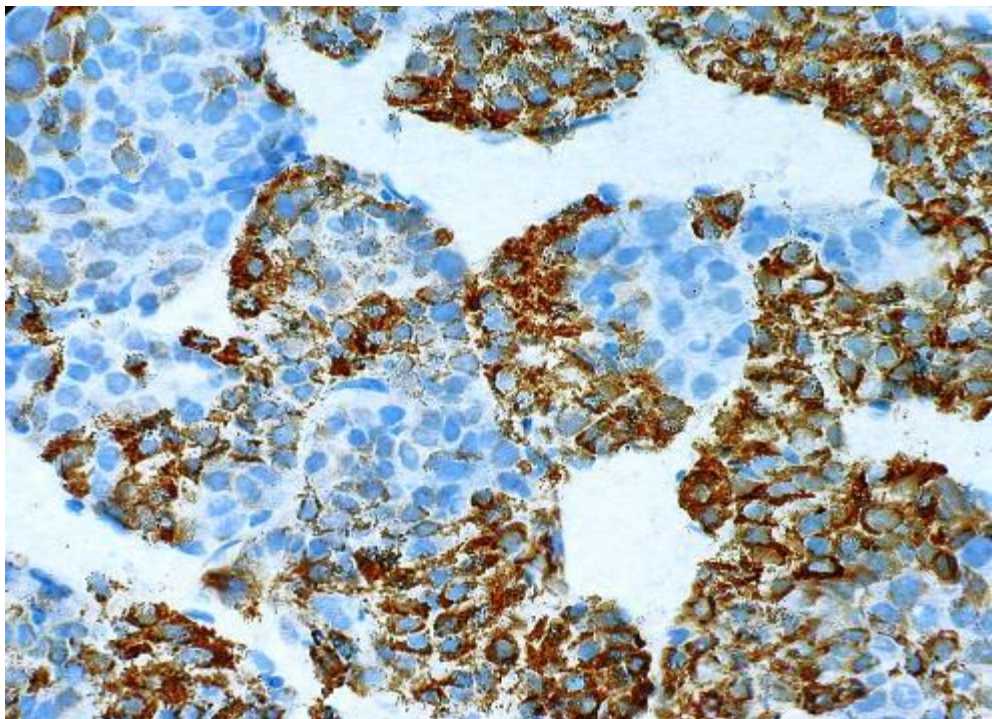


Рис. 3.21 Нерівномірний розподіл імунопозитивних клітин з високим рівнем гранулярної цитоплазматичної експресії HepPar-1 в трабекулярному патерні гепатоцелюлярного раку. Мо *a-Hu Hepatocyte, Clone OCH1E5*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x400

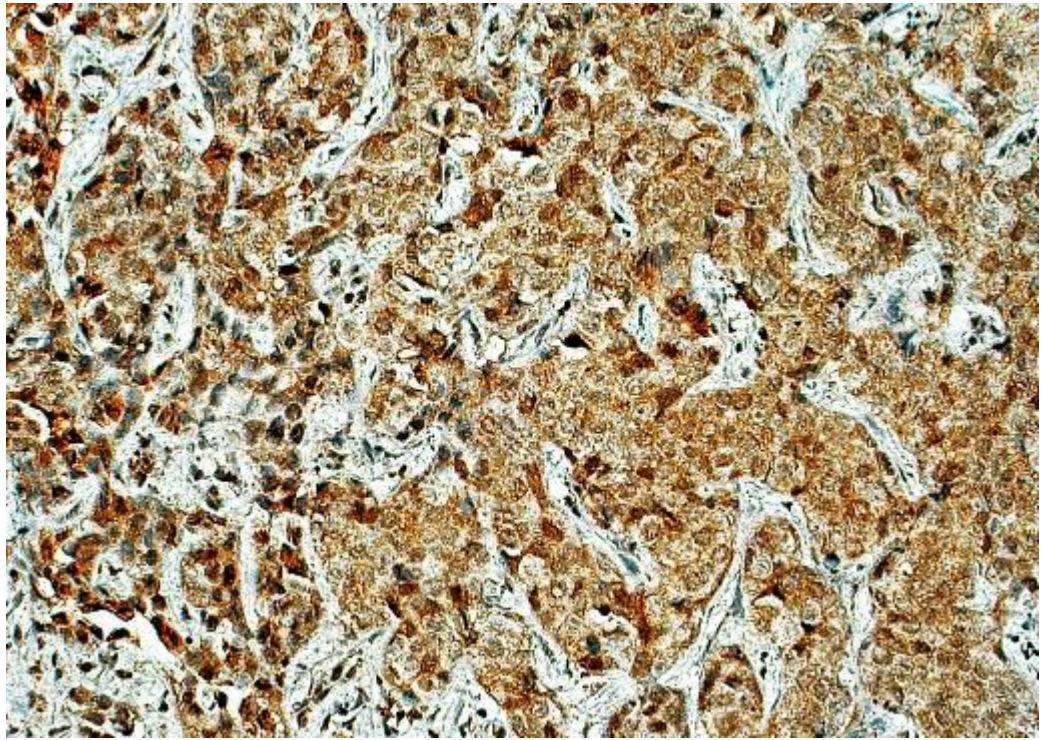


Рис. 3.22 Високий рівень цитоплазматичної та ядерної експресії АФР клітинами в солідноклітинному патерні гепатоцелюлярного раку. *Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 400.

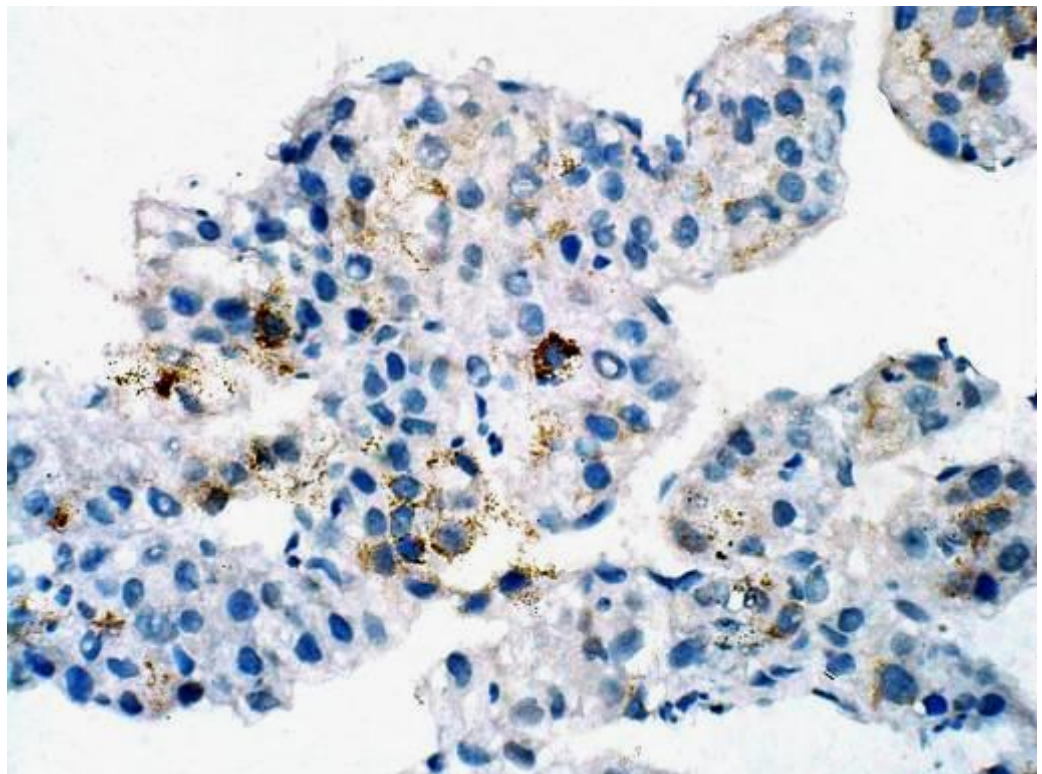


Рис. 3.23 Невелика кількість АФР-позитивних клітин в трабекулярному патерні гепатоцелюлярного раку. *Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 650.

При ІГХ дослідженні експресії СК7 клітинами гепатоцелюлярного раку нами було встановлено, що СК7-позитивні клітини розподілялися в пухлини у вигляді осередкових скупчень (рис.3.24). За даними фотоцифрової морфометрії середня площа СК7-іммунопозитивних клітин в ГЦР становила всього $21,08 \pm 5,19\%$ СПГЗ. Експресія СК7 клітинами гепатоцелюлярного раку була негативною у 62,26% пацієнтів та позитивною у 37,74% хворих. У 22,64% хворих визначався низький рівень експресії СК7 клітинами ГЦР, що становив $41,45 \pm 5,18$ УООЩ, у 10,37% хворих мав місце помірний рівень експресії ($79,52 \pm 14,68$ УООЩ), у невеликого відсотку (4,73%) хворих виявлявся високий рівень експресії СК7 клітинами ГЦР (рис.3.25), що становив $121,08 \pm 17,22$ УООЩ.

За результатами проведених нами ІГХ досліджень експресія СК20 виявлена у 30,13% хворих на гепатоцелюлярний рак, у 69,87% випадків експресія цього маркера була негативною. Групи СК20-іммунопозитивних клітин визначалися в гістологічних зрізах ГЦР у вигляді осередкових скупчень, за даними фотоцифрової морфометрії СК20-іммунопозитивні клітини займали $29,35 \pm 17,31\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку. Високий рівень експресії СК20 клітинами ГЦК, що досягав $112,71 \pm 11,88$ УООЩ, виявлений у 19,74% хворих (рис.3.26), помірний рівень експресії в $75,03 \pm 14,85$ УООЩ відзначений у 4,93% хворих, низький рівень експресії СК20 клітинами ГЦР, що становив $24,34 \pm 11,01$ УООЩ, був виявлений у 5,46% хворих.

Виконані нами імуногістохімічні дослідження показали, що в клітинах гепатоцелюлярного раку не визначається експресія ЕМА (MUC1), відсутня експресія муцину MUC5AC, транскрипційного фактору CDX2 і онкопротеїна CA125. В ендотелії судин і синусоїдів гепатоцелюлярного раку визначається експресія CD31 антигену, а в ендотелії атипових синусоїдів визначається експресія CD34, яка допомагає визначити наявність та контури атипових синусоїдів в солідноклітинному патерні гепатоцелюлярної карциноми (рис.3.27).

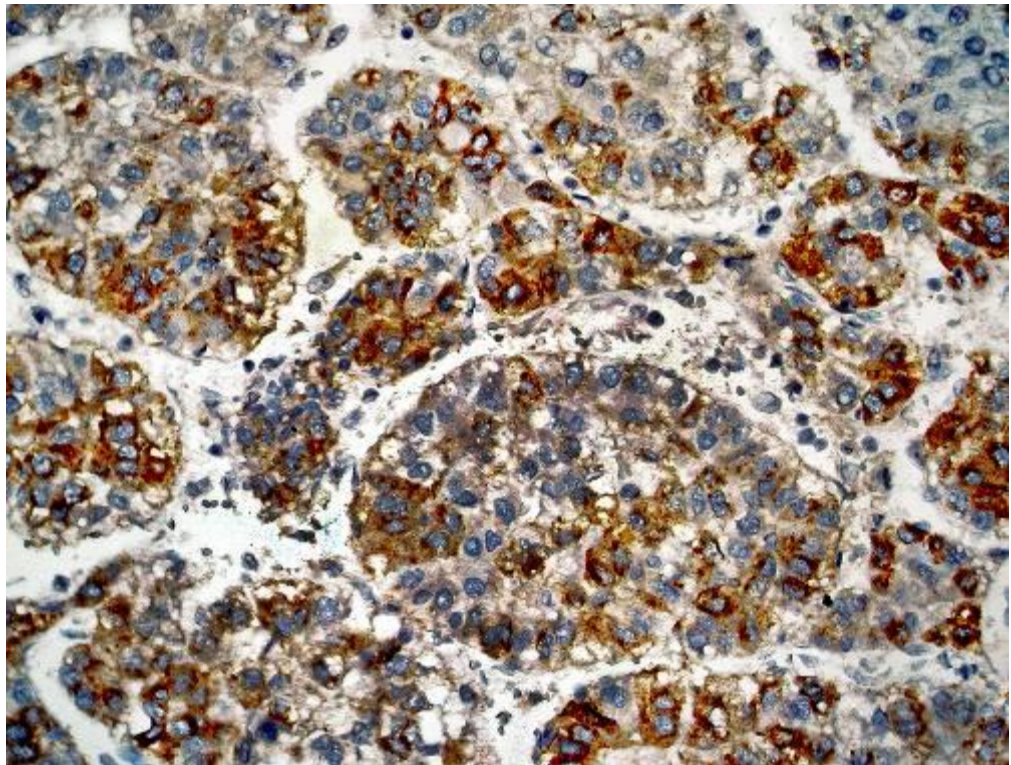


Рис. 3.24 Осередкова експресія цитокератину 7 клітинами гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Cytokeratine 7, Clone OV-TL 12/30*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 400.

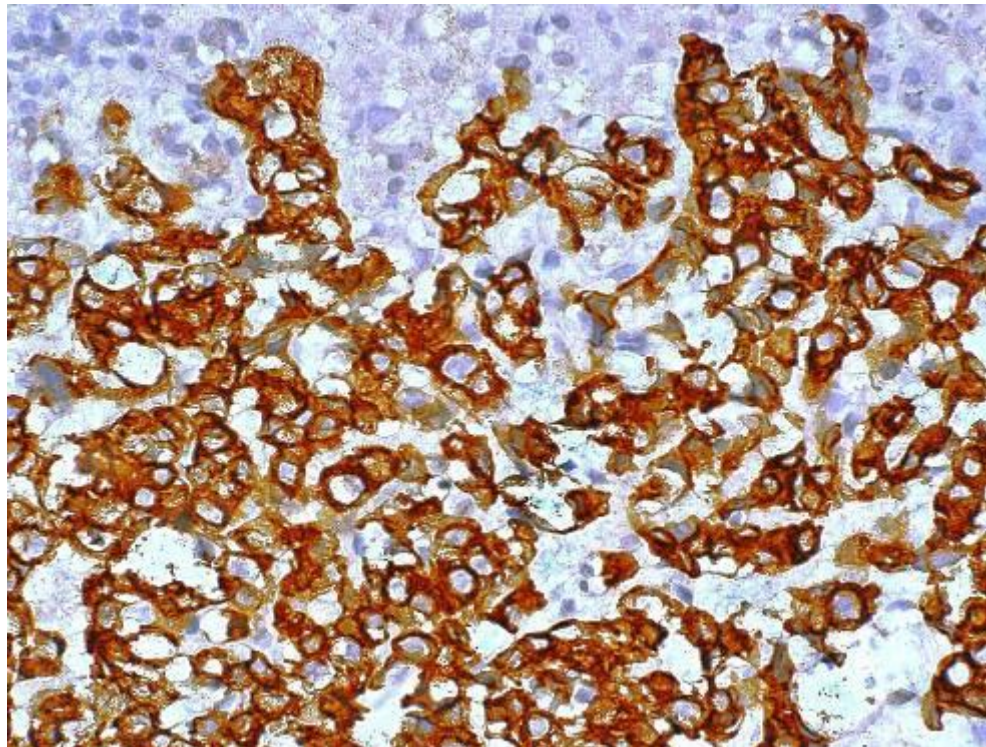


Рис. 3.25 Високий рівень цитоплазматичної експресії цитокератину 7 клітинами гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Cytokeratine 7, Clone OV-TL 12/30*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

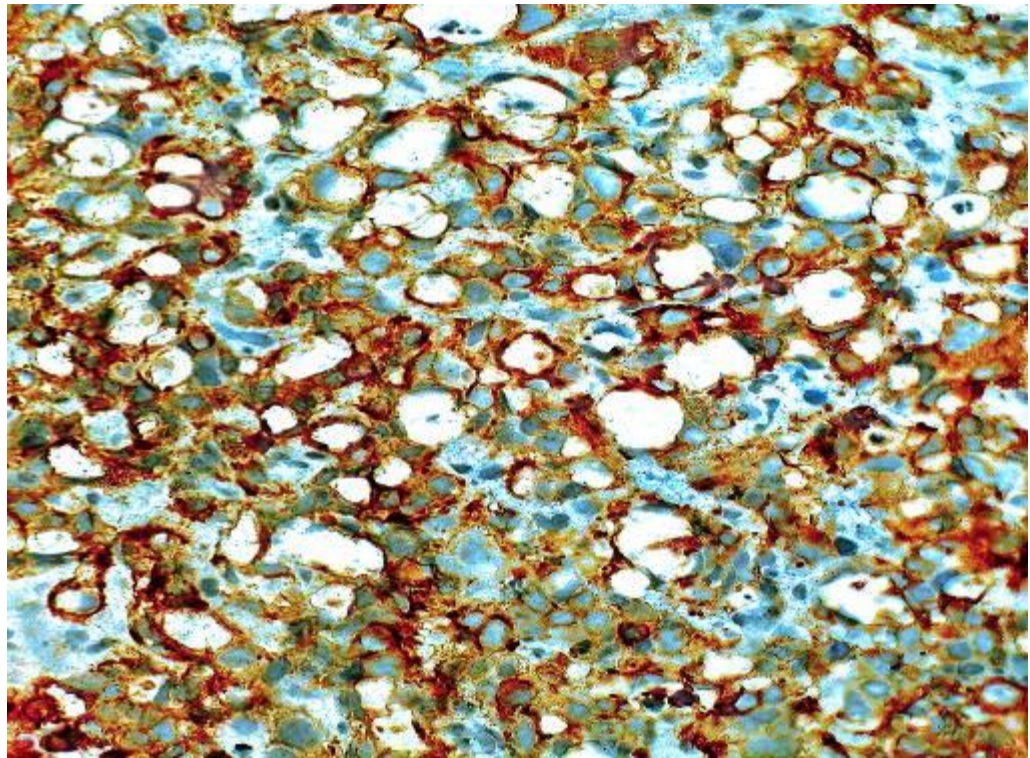


Рис. 3.26 Високий рівень експресії цитокератину 20 клітинами гепатоцелюлярного раку. Мо *a-Hu Cytokeratine 20, Clone Ks20*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

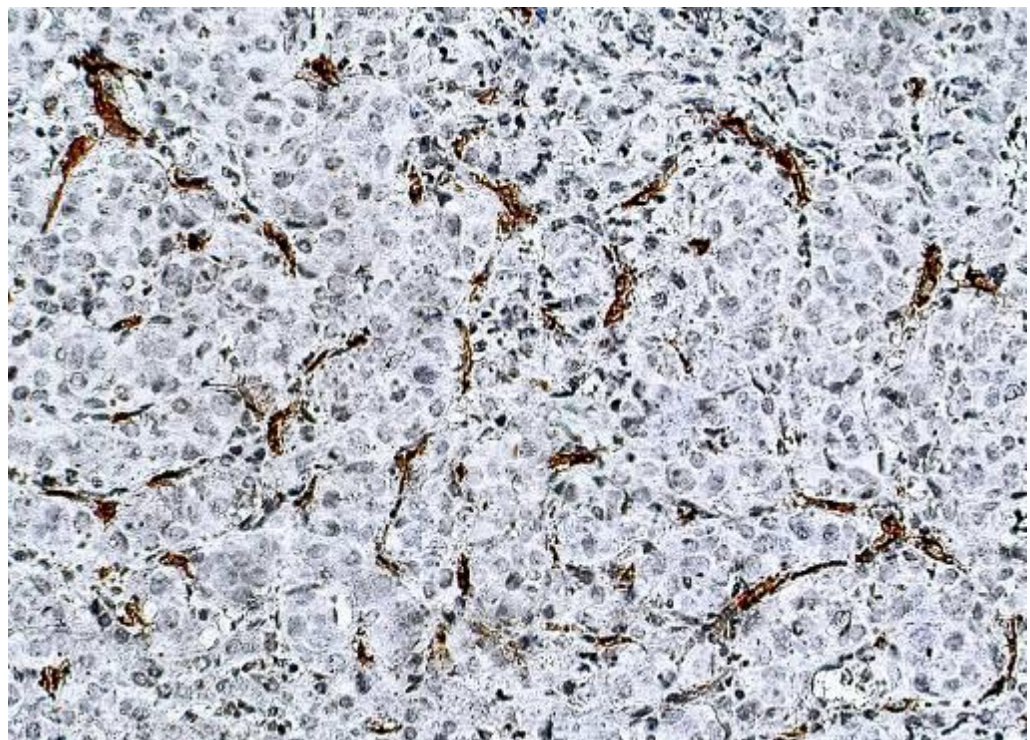


Рис. 3.27 Експресія CD34 ендотелієм атипівих синусоїдів в солідноклітинному патерні гепатоцелюлярного раку. Мо *a-Hu CD34, Clone QVEnd/10*. Система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 400.

Кореляційний аналіз показав, що у хворих на ГЦР спостерігається прямий слабкий зв'язок між рівнем експресії клітинами пухлини AFP і HepPar-1 (коефіцієнт Пірсона $r = +0,25$). Між рівнем експресії AFP і CK7, AFP та CK20 в гепатоцелюлярному раку спостерігається пряма середньої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = +0,5$), а між рівнем експресії HepPar-1 і CK7, HepPar-1 і CK20 спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +1$), що найбільш ймовірно відображає потенційні можливості ракових клітин до гепатоцитарного та біліарного диференціювання. Кореляційні взаємозв'язки між рівнями експресії AFP, HepPar-1, CK7 і CK20 в ГЦК наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Кореляційні взаємозв'язки між рівнями експресії AFP, HepPar-1, CK7 і CK20 в гепатоцелюлярному раку печінки

Характеристика рівня експресії	Експресія маркерів гепатоцелюлярного раку			
	AFP(A)	HepPar-1 (B)	CK7(C)	CK20(D)
Середній рівень експресії %	76,15±31,30	57,52 ±35,21	52,63 ±45,11	25,46 ±20,46
p	<0,05			
r_{A-B}	+0,25			
r_{A-C}	+0,5			
r_{A-D}	+0,5			
r_{B-C}			+1	
r_{B-D}			+1	

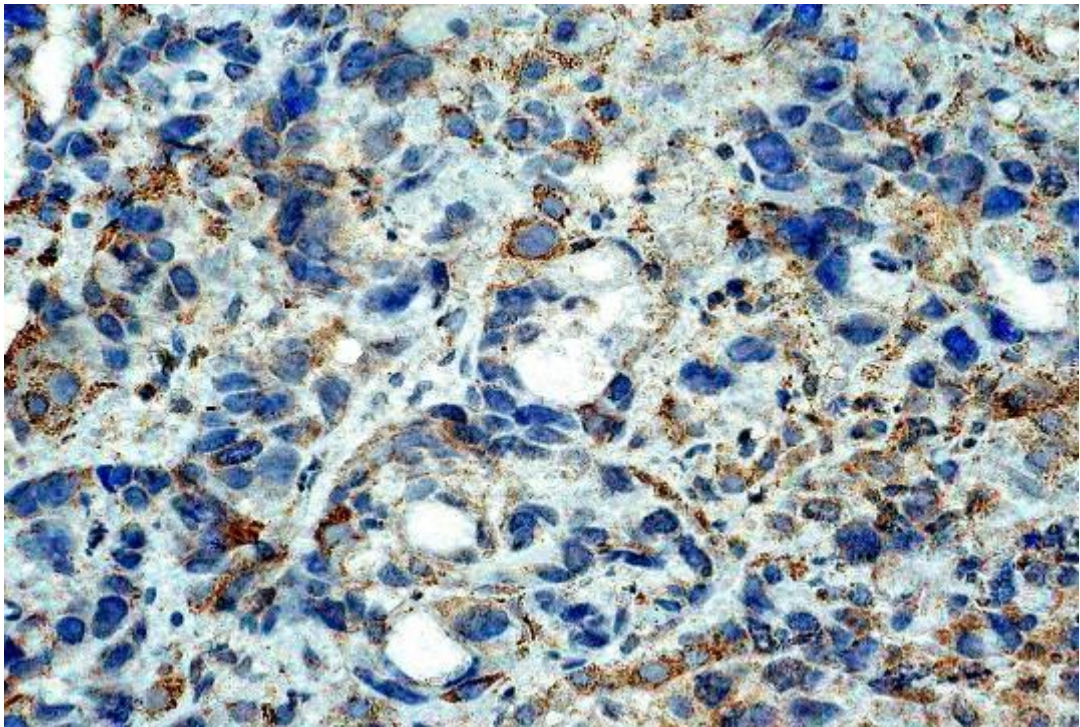
Імуногістохімічні дослідження трепанобіоптатів 50 хворих на гепатоцелюлярний рак показали, що в цитоплазмі пухлинних клітин спостерігалася дифузно-гранулярна експресія HBsAg різної інтенсивності, а в ядрах і в цитоплазмі - визначалася дифузно-гранулярна експресія HBcAg різної інтенсивності. Неупорядковано розташовані нечисленні зірчасті клітини і фібробласти пухлини були імунонегативними, тобто в них експресія HBcAg і HBsAg не визначалась.

За результатами виконаних досліджень встановлено, що у 50 хворих (або у 100% обстежених хворих на ГЦР печінки) в пухлинних клітинах мала місце цитоплазматична і ядерна експресія HBsAg. При цьому, в пухлинній тканині ГЦР у 8,0% хворих визначався слабкий рівень експресії HBsAg (наявність 1-33% іммунопозитивних клітин), у 18,0% пацієнтів виявлявся помірний рівень експресії цього антигену (наявність в пухлині 34-66% іммунопозитивних клітин), у 74,0% хворих виявлявся значно виражений рівень експресії HBsAg в пухлині з наявністю в ній 67-100% іммунопозитивних клітин (рис.3.28). За результатами напівкількісного підрахунку інтенсивність ІГХ реакції з HBsAg в пухлинних клітинах ГЦ раку була слабкою у 12,0% хворих, помірною - у 18,0% пацієнтів і вираженою - у 70,0% хворих.

Цитоплазматична експресія HbsAg в пухлинній тканині виявлена у 82,0% хворих на гепатоцелюлярний рак печінки. В пухлинній тканині ГЦР у 12,2% хворих виявлявся слабкий рівень експресії HBsAg (наявність 1-33% іммунопозитивних клітин) (рис. 3.29), у 14,63% пацієнтів визначався помірний рівень експресії цього антигену з наявністю у пухлині 34-66% іммунопозитивних клітин, у 55,17% хворих виявлявся значно виражений рівень експресії HBsAg, у 18,0% хворих експресія HBsAg в тканині ГЦР не визначалася. Інтенсивність ІГХ реакції з HBsAg в клітинах ГЦ раку була слабкою у 12,95% хворих, помірною - у 53,65% хворих і вираженою - у 15,4% хворих.

Нами встановлено, що у 74,0% хворих на ГЦР експресія HBsAg виявлялася тільки в пухлинній тканині, у 26,0% хворих вона визначалася як в пухлинних клітинах, так і в гепатоцитах навколишньої тканини печінки. У 58,18% пацієнтів експресія HBsAg виявлялася тільки в клітинах ГЦР, а у 23,82% пацієнтів експресія цього антигену визначалася одночасно і в клітинах пухлини і в гепатоцитах навколишньої непухлинної тканини.

За результатами проведеного ІГХ аналізу встановлено, що середній рівень експресії HBsAg клітинами ГЦР склав $66,62 \pm 10,09\%$, що достовірно



3.28 Значний рівень експресії HBcAg в цитоплазмі клітин гепатоцелюлярного раку. *Rb a-Hu Primary Hepatitis B Virus Core Antigen*. Система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

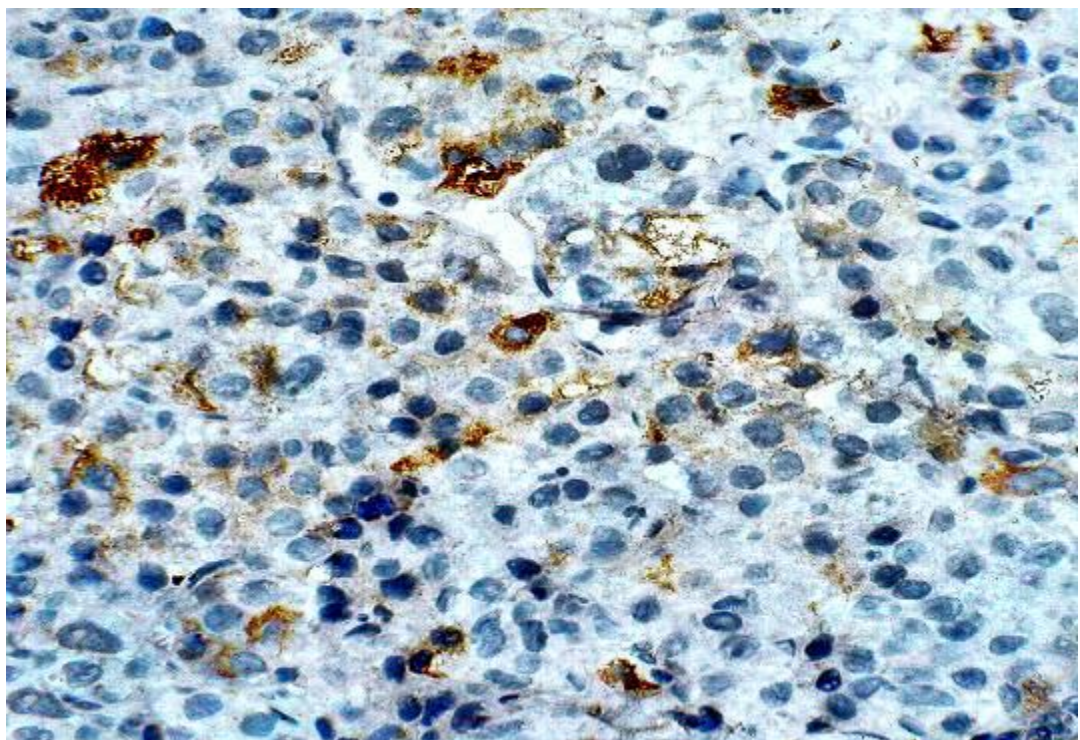


Рис.3.29 Слабкий рівень експресії HBsAg в клітинах гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Primary Hepatitis B Virus Surface Antigen, Clone 3E7*. Система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

більше, ніж середній рівень експресії HbsAg, який склав $50,58 \pm 26,7\%$ ($p < 0,05$). При кореляційному аналізі встановлено (табл.3.2), що у хворих на гепатоцелюлярний рак між рівнем експресії пухлинними клітинами HBcorAg і HBsAg спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +0,83$).

Таблиця 3.2

Аналіз рівня експресії HBcorAg і HBsAg у хворих на гепатоцелюлярний рак

Характеристика рівня експресії HBcorAg и HBsAg	Гепатоцелюлярний рак	
	HBcorAg (A)	HBsAg (B)
Середній рівень експресії у %	$66,62 \pm 10,09$	$50,58 \pm 26,7$
p	$<0,05$	
r_{A-B}	$+0,87$	

Імуногістохімічне дослідження фіброламельярного раку показало, що в його пухлинних клітинах визначається високий рівень гранулярної цитоплазматичної експресії HerPar-1 і високий рівень цитоплазматичної експресії CK7, але водночас пухлинні клітини є AFP імунонегативними. На відмінність від інших варіантів ГЦР в клітинах фіброламельярного раку визначається апікально-поверхнева експресія EMA (MUC1) (рис.3.30) та цитоплазматична експресія CK20, які вважаються маркерами біліарного диференціювання.

Комбінований гепато-холангіоцелюлярний рак характеризувався наявністю солідноклітинного і трабекулярного патернів з гепатоцитоподібних клітин, а також дуктулоподібного патерну в фібропластичній стромі з холангіоцитоподібних клітин. В результаті проведеного ІГХ аналізу з'ясувалося, що в дуктулоподібному патерні, розташованому в фібропластичній стромі комбінованої пухлини, визначалися CK7 і CK19-позитивні клітини (рис. 3.31). Слід відзначити, що у фібропластичній стромі, в якій розташовувався дуктулоподібний патерн

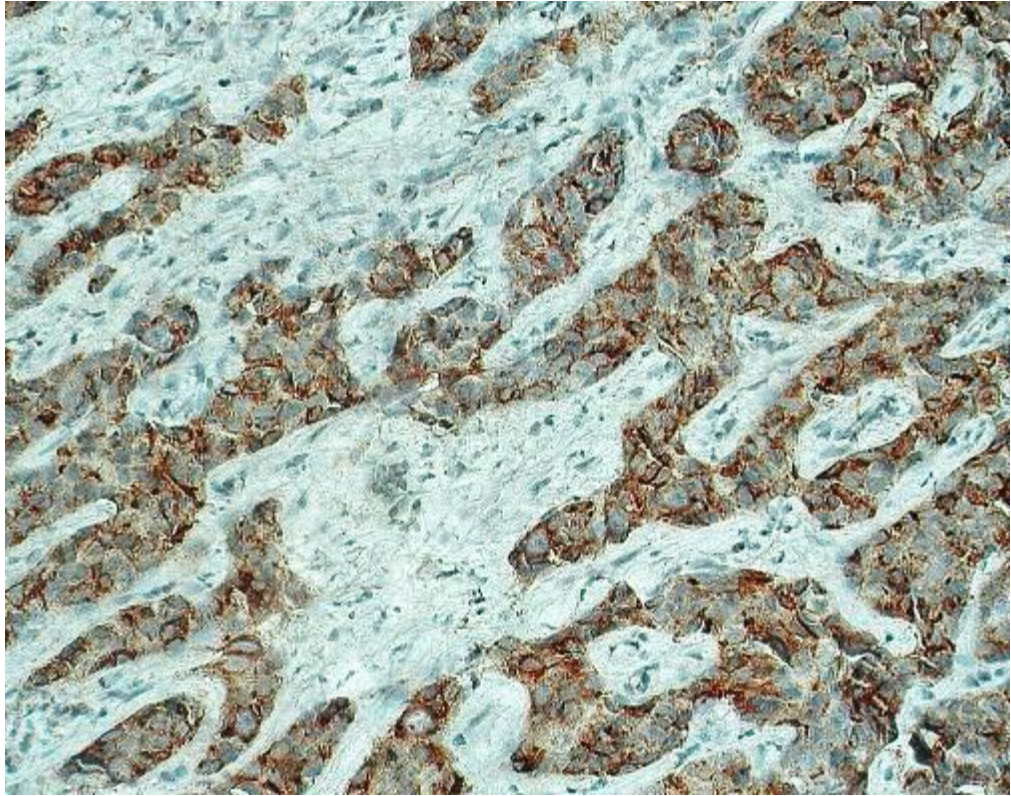


Рис.3.30 Апікально-поверхнева експресія ЕМА (MUC1) в пухлинних клітинах фіброламелярного раку. *Rb a-Hu MUC1, Clone S.854.6*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. х 650.

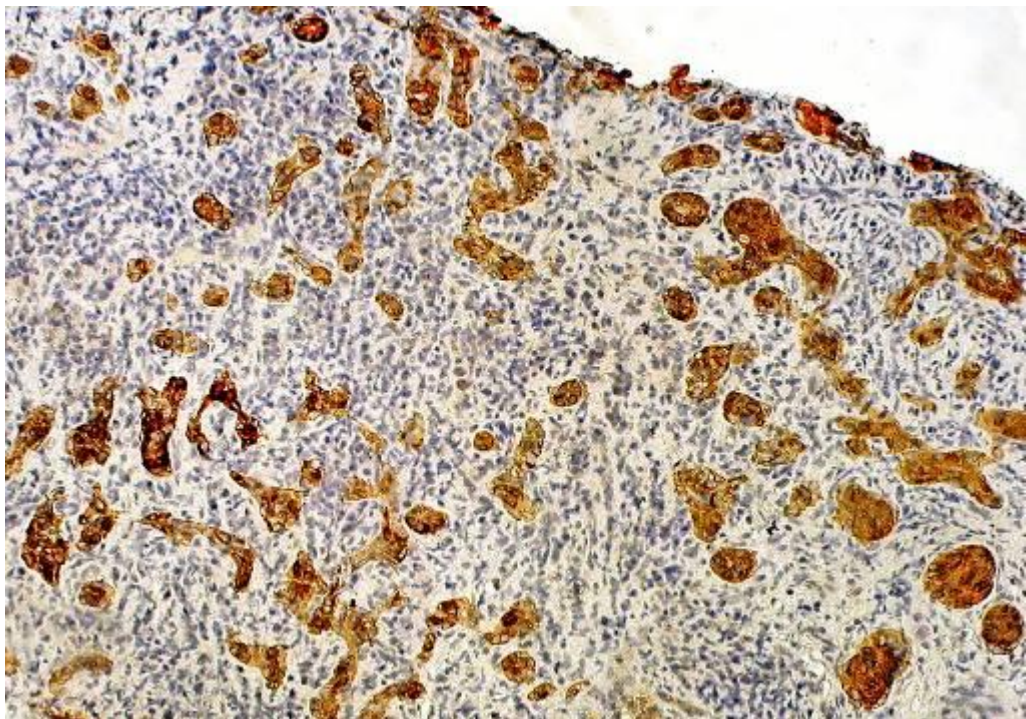


Рис.3.31 Експресія СК7 клітинами дуктулоподібного патерну комбінованого гепато-холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Cytokeratine 7, Clone OV-TL 12/30*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. х 250.

комбінованої гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярної пухлини, окрім сполучнотканинних волокон, завжди визначалась значна кількість лімфоцитів, фібробластів і інших недиференційованих клітин.

В солідноклітинному і трабекулярному патернах комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку визначалися HerPar-1-позитивні, AFP-позитивні і CK20 іммунопозитивні клітини (рис.3.2, 3.33).

Результати вивчення експресії HerPar-1, AFP, цитокератинів 7,8,19,20, а також S100, TTF-1, CDX2 в солідноклітинному, трабекулярному і дуктулоподібному патернах комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку наведені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Імуногістохімічна характеристика основних патернів комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку печінки

Паттерн пухлини	Експресія маркера								
	<i>HerPar 1</i>	<i>AFP</i>	<i>CK7</i>	<i>CK8</i>	<i>CK19</i>	<i>CK20</i>	<i>S100</i>	<i>TTF-1</i>	<i>CDX2</i>
Солідно-клітинний	+	+	-	-	-	-/+	-	-/+	-
Трабекулярний	+	+	-/+	-	-/+	+	-	-	-
Дуктулоподібний	-	-	+	-/+	+	-	-	-	-

З даних, наведених у таблиці 3.3, випливає, що в комбінованому гепато-холангіоцелюлярному раку в його солідно-клітинному і трабекулярному патернах має місце експресія HerPar-1 (рис.3.29) і AFP, яка свідчить про наявність пухлинних клітин гепатоцитарного диференціювання. У цих патернах комбінованої пухлини клітини іммунонегативні по цитокератинам 7, 8 і 19, а також по білку S100 і транскрипційному фактору CDX2. Одночасно з цим, в трабекулярному патерні визначається експресія CK20. У дуктулоподібному патерні цієї комбінованої пухлини визначається експресія цитокератину 7 (рис.3.30) і цитокератину 19, що свідчить про наявність в пухлині клітин холангіоцитарно-біліарного диференціювання.

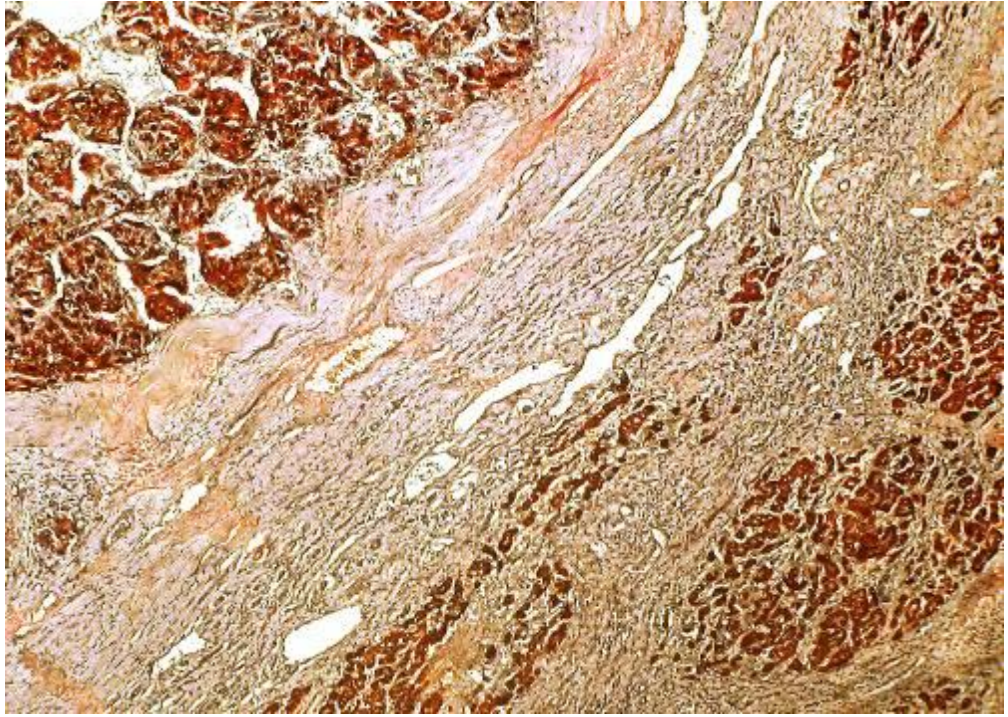


Рис.3.32 Цитоплазматична експресія HepPar-1 в клітинах трабекулярного (зверху, зліва) і солідноклітинного патернів (знизу, справа) комбінованого гепато-холангіоцелюлярного раку. Мо *a-Hu Hepatocyte*, Clone *OCH1E5*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x 150.

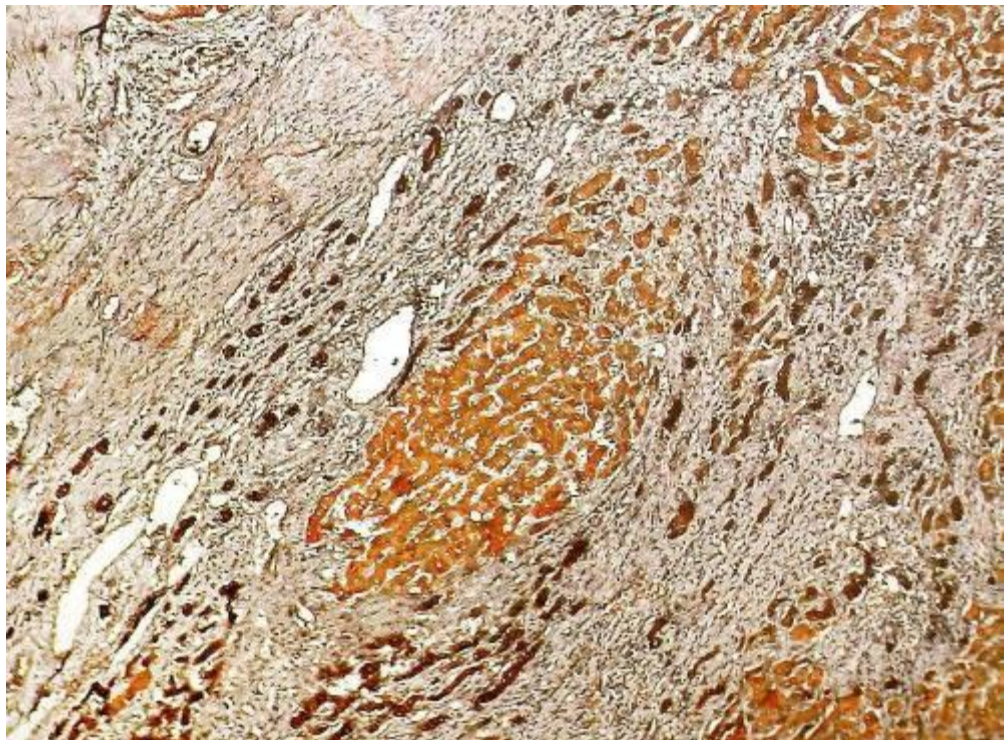


Рис.3.33 Цитоплазматична експресія CK7 клітинами дуктулоподібного патерну комбінованого гепато-холангіоцелюлярного раку. Мо *a-Hu Cytokeratine 7*, Clone *OV-TL 12/30*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x 250.

3.3. Диференційна імуногістохімічна характеристика гепатоцелюлярного раку та метастазів в печінку інших пухлин солідноклітинної і трабекулярної мікроструктури

Проведені патоморфологічні дослідження показали, що при первинній діагностиці трепанобіоптатів печінки з попереднім клінічним діагнозом «рак печінки-?, метастаз в печінку злоякісної пухлини іншої невстановленої первинної локалізації-?», коли пухлинні клітини не утворюють характерні для диференційованого ГЦР класичні ацинарні та трабекулярні патерни, завжди виникає необхідність проведення диференційної діагностики між помірнодиференційованим солідно-клітинним або низькодиференційованим трабекулярним ГЦР та метастазами у печінку інших пухлин солідноклітинної та трабекулярної мікроструктури. В наших дослідженнях саме таку мікроскопічну будову в трепанобіоптатах печінки, крім ГЦР, мали метастази меланом, раку молочної залози, злоякісних нейроендокринних пухлин і раку передміхурової залози. Для їх диференційної діагностики ми спочатку застосовували загальноприйнятту скринінгову ІГХ панель з 4-х антитіл (пан-цитокератин, загальний лейкоцитарний антиген, віментин, S100), а потім для пан-цитокератин-позитивних та S100-позитивних пухлин застосовували додаткові ІГХ панелі, що включали гепатоцитарні (HepPar-1, α -FTP, гліпікан-3), цитокератинові (CK7, CK20), меланоцитарні (HMB45, тирозиназа), нейроендокринні (ChG, Syn, CD56), рецепторно-гормональні (ER, маммаглобін, Andr, PSA) і муцинозні (MUC1, MUC2) маркери, а також маркери транскрипційних (CDX2, TTF-1) факторів.

Виконані ІГХ дослідження підтвердили, що помірно диференційований ГЦР відрізняється від метастазів у печінку інших пухлин солідно-трабекулярної мікроструктури гранулярною цитоплазматичною експресією пухлинними клітинами HepPar-1, варіабельною експресією α -FTP, цитокератинів 7 і 20, а також відсутністю експресії S100, HMB 45, Tir, ChG, Syn, CD56, ER, Mgl, Andr, PSA.

Результати проведених нами ІГХ досліджень по виявленню експресії HepPar-1, α -FTP, CK7, CK20, S100, HMB 45, Tir, ChG, Syn, CD56, ER, Mgl, Andr, PSA в ГЦР і метастатичних пухлинах солідно-клітинної і трабекулярної мікроструктури наведені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Імунофенотип гепатоцелюлярного раку печінки і метастазів у печінку інших пухлин солідноклітинної і трабекулярної мікроструктури

Тип пухлини	Експресія маркера													
	Hep Par-1	α -FTP	CK7	CK20	S100	HMB 45	Tir	ChG	Syn	CD56	ER	Mgl	PSA	Andr
Гепатоцелюлярний рак печінки (n=30)	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Метастаз меланому (n=12)	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+/-	-	-	-	-
Метастаз рака молочної залози (n=10)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Метастаз нейроендокринної пухлини (n=12)	-	-	-	-	+/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Метастаз раку передміхурової залози (n=2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Виконаний порівняльний ІГХ аналіз показав, що визначення цитокератинів в диференційній діагностиці первинних і метастатичних пухлин у печінці має допоміжне значення внаслідок неоднозначного рівня їх експресії в помірно диференційованому ГЦР з «домішкою» похідних прогеніторних клітин холангіо- і гепатоцелюлярного диференціювання, а також в метастазах в печінку раку іншої первинної локалізації.

Патоморфологічний діагноз метастазу у печінку меланому не викликає сумніву при наявності в пухлинних клітинах меланіну. Метастази безпігментної (ахроматичної) меланому в печінці складають солідно-клітинні або трабекулярні пухлинні патерни із монотонних або поліморфних клітин з рясною цитоплазмою і поліморфними ядрами (рис.3.34А,Б). В клітинах печінкових метастазів меланому визначається експресія білкового антигену S-100, меланосомального глікопротеїну HMB45 (рис.3.35А,Б), CD56 і

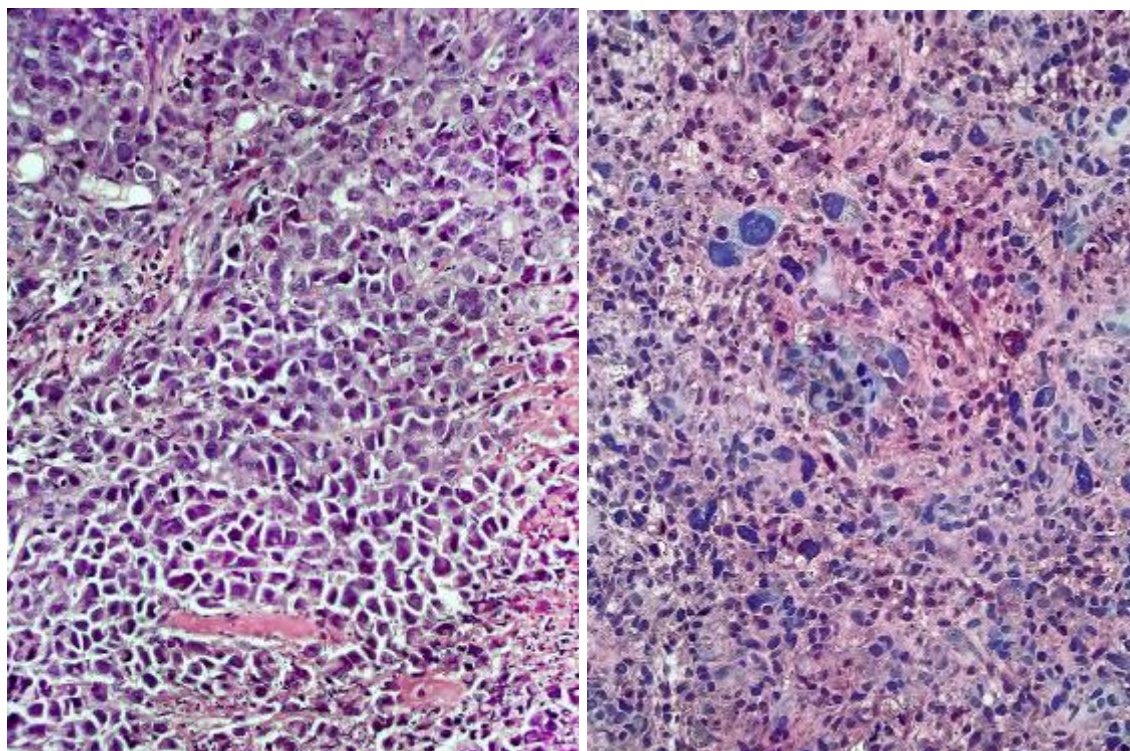


Рис. 3.34 А,Б. Метастази безпигментної меланоми в печінці складають трабекулярні (А) або солідно-клітинний (Б) пухлинні патерни. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.А і Б: х 400.

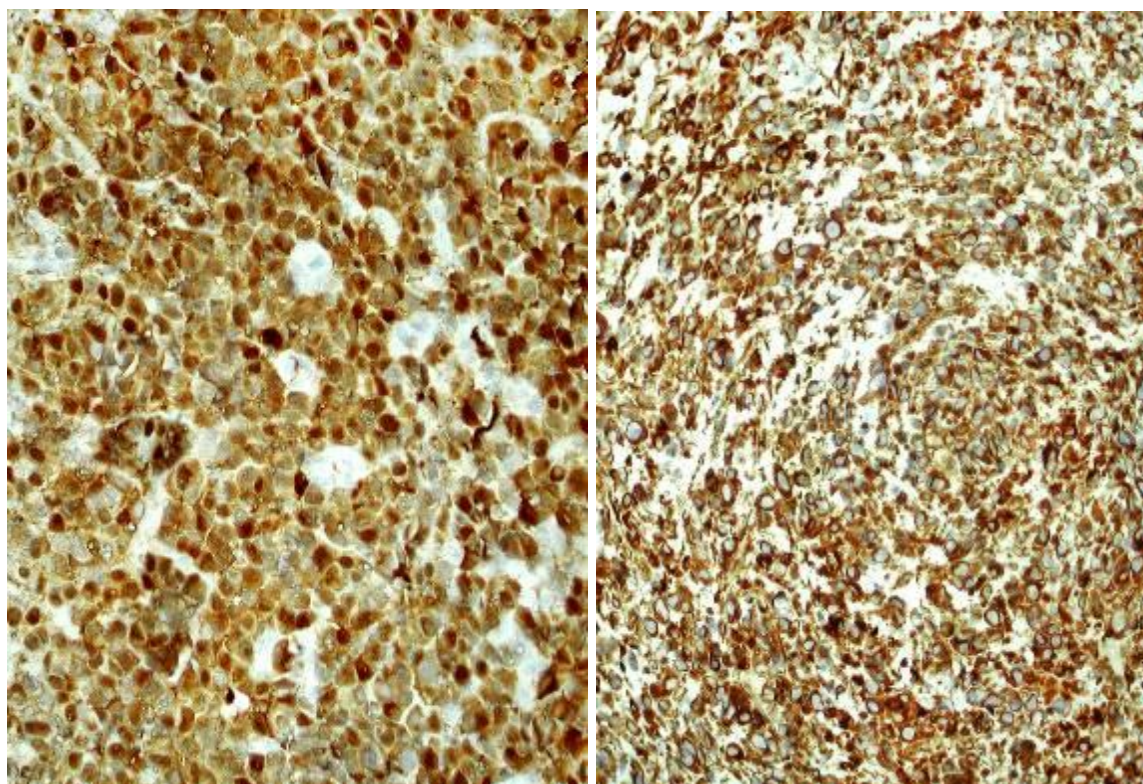


Рис. 3.35 А,Б. Експресія в метастазі меланоми S-100 (А) і Melanosome (Б). Мо *a-Hu S100 Protein, Clone 4c4.9*, Мо *a-Hu Melanosome, Clone HMB45*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. А і Б: х 400.

ферменту тирозинази (див.табл. 3.4). В клітинах метастазів меланоми не виявляється експресія маркерів ГЦР, таких як HerPar-1 і α -FTP.

Метастази нейроендокринних пухлин в печінці мали вигляд пухлин з нерозвиненою стромою, сформованих стрічкоподібними трабекулами з відносно мономорфних клітин з помірною цитоплазмою, округлими ядрами і погано помітними ядерцями, з наявністю між клітинними трабекулами щілеподібних судин синусоїдального типу (рис.3.36). У клітинах метастазів нейроендокринних пухлин виявляється різної інтенсивності експресія хромограніна, синаптофізіна (рис.3.37А,Б) і CD56 (рідко – білка S-100), та не визначається експресія цитокератинів 7 і 20, рецепторів естрогенів і андрогенів, а також не спостерігається експресія гепатоцитарних (HerPar-1, α -FTP) і меланоцитарних (HMB45, тирозиназа) маркерів (див.табл. 3.4).

Метастази раку молочної залози в печінці утворювали відносно мономорфні еозинофільні клітин з монотонними округлими ядрами і ледь помітними ядерцями, які складали трабекулярні, гніздоподібні і тубулярні мікроструктури (рис.3.38). Результати ІГХ досліджень показали, що в клітинах печінкових метастазів раку молочної залози визначається експресія СК7, рецепторів до естрогену (рис.3.39), маммаглобіна. В клітинах метастазів раку молочної залози в печінці не виявляється експресія цитокератину 20, Andr, PSA, а також гепатоцитарних (HerPar-1, α -FTP), меланоцитарних (HMB45, тирозиназа) і нейроендокринних (ChG, Syn, CD56) маркерів (див. табл. 3.4).

Метастази раку передміхурової залози в печінці мали солідно-трабекулярну мікроструктуру. В обраній нами мінімальній ІГХ панелі вони відрізнялися експресією рецепторів андрогенів і простатспецифічного антигену (PSA), в клітинах метастазів раку передміхурової залози в печінці не виявлялася експресія цитокератинів 7 і 20, а також гепатоцитарних (HerPar-1, α -FTP), меланоцитарних (HMB45, тирозиназа) і нейроендокринних (ChG, Syn, CD56,) маркерів (див.табл 3.4).

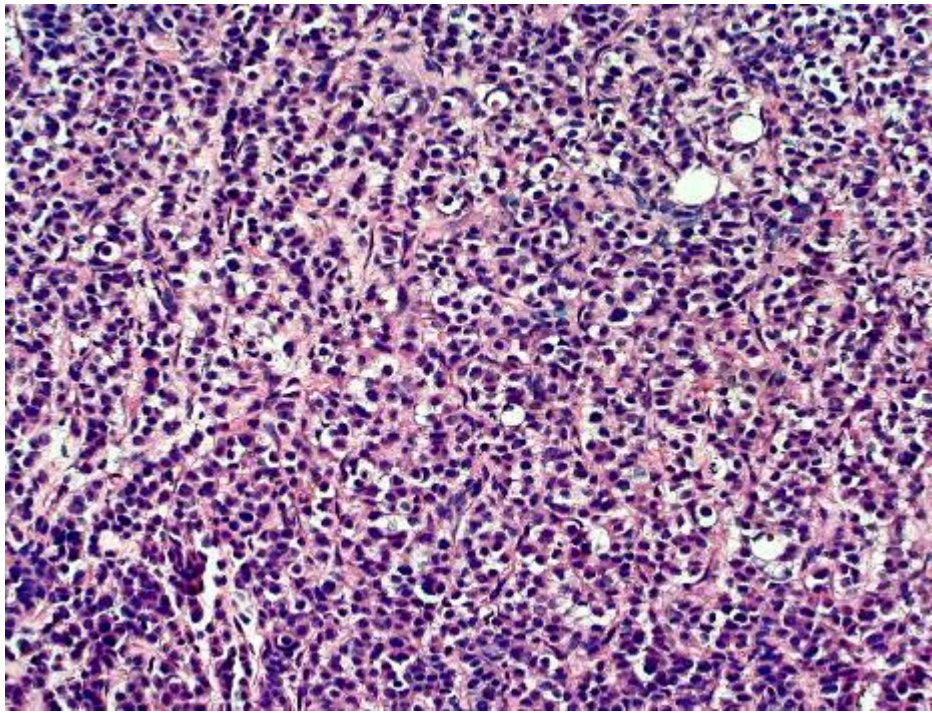


Рис.3.36 Метастаз в печінку нейроендокринної пухлини. Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: x 400.

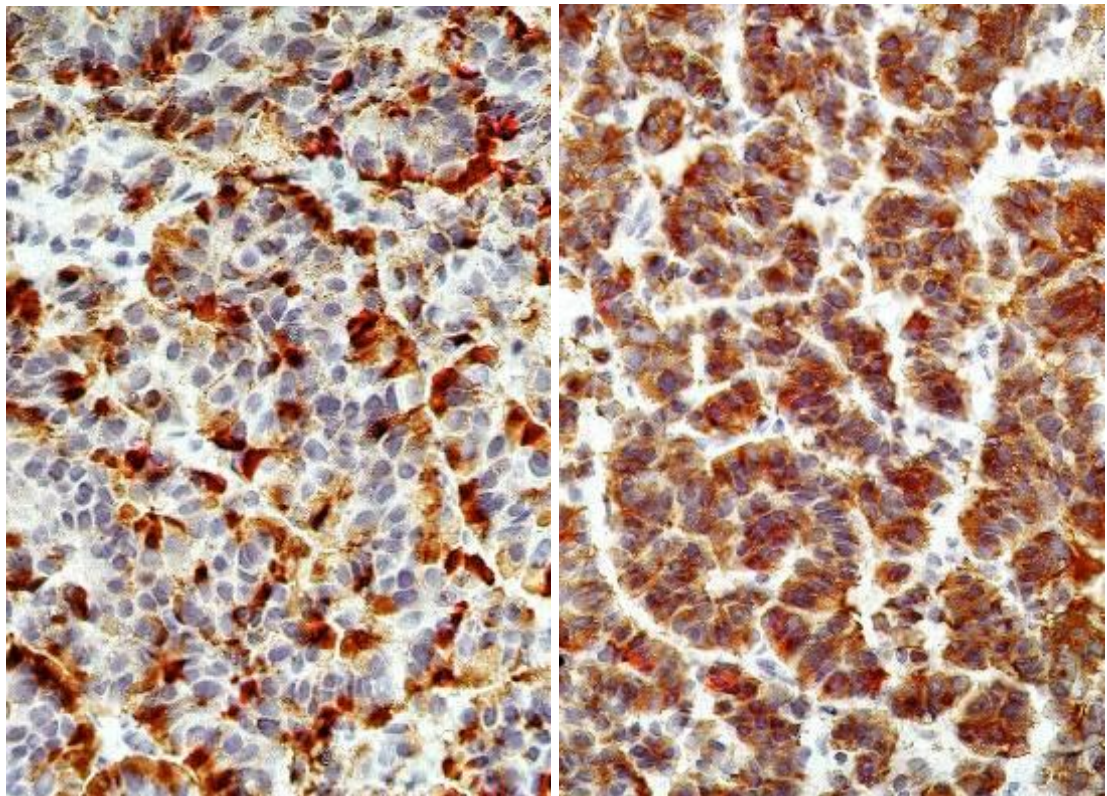


Рис. 3.37 А,Б. Експресія в метастазі нейроендокринної пухлини хромограніна (А) і синаптофізіна (Б). *Rb a-Hu Chromogranin A, Mo a-Hu Synaptophysin, Clone SY38*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб.А і Б: x 650.

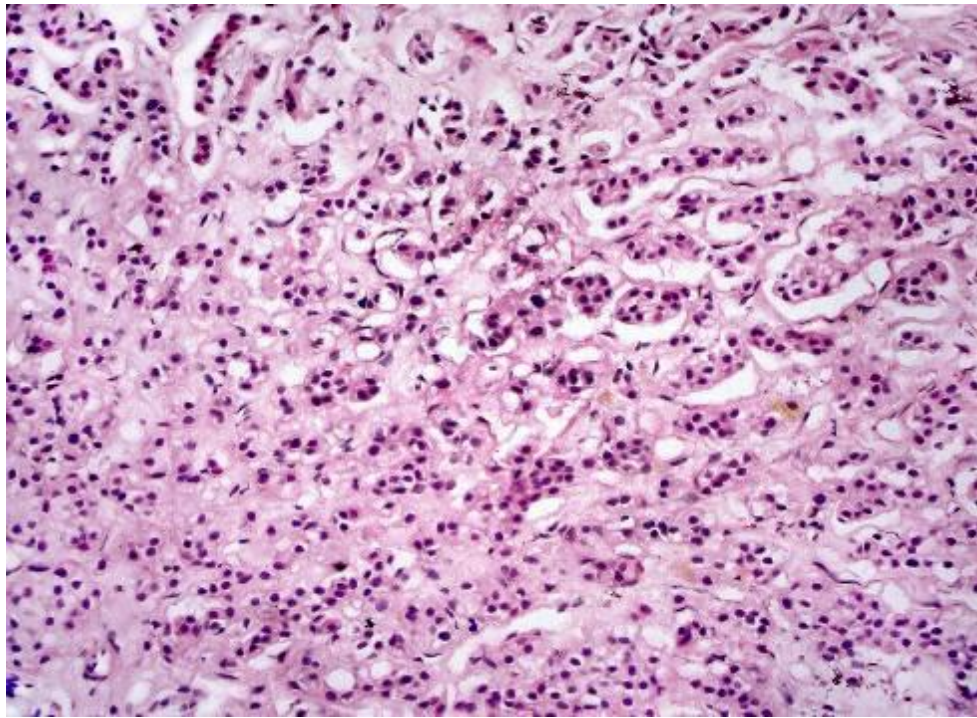


Рис. 3.38 Метастаз в печінку рака молочної залози трабекулярно-, гніздоподібно-тубулярної мікроструктури. Зabarвлення гематоксилином і еозином. Зб.: x 400.

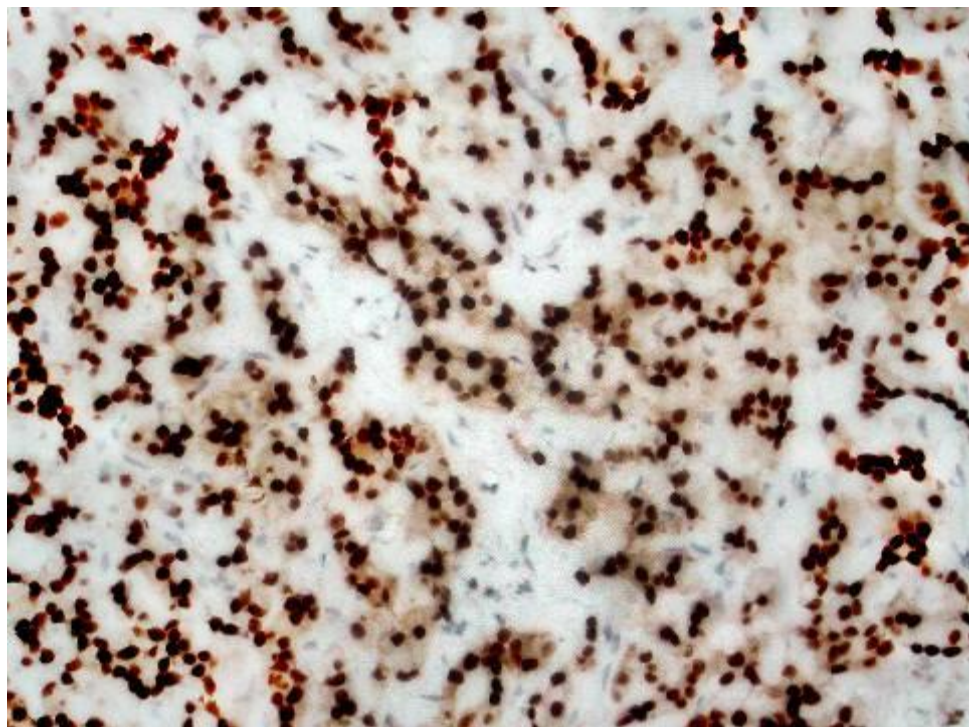


Рис.3.39 Експресія рецепторів до естрогену клітинами метастазу рака молочної залози. *Rb a-Hu Estrogen Receptor Alpha, Clone SP1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. x 250.

Таким чином, отримані нами результати показали, що виявлення в трепанобіоптатах печінки пухлини солідно-трабекулярної структури з імунотипом CK7 + / CK20- / Er + / mammaglobin + може свідчити про метастаз раку молочної залози; виявлення CK7- / CK20- / Andr + / PSA + пухлини - про метастаз раку передміхурової залози; але остаточна діагностика проводиться з урахуванням УЗД, клініко-лабораторних даних або при дослідженні трепанобіоптату первинної пухлини.

Таким чином, проведені дослідження показали, що патоморфологічна диференційна діагностика в трепанобіоптатах печінки первинного раку печінки і метастазів злоякісних пухлин солідно-трабекулярної і тубулярно-залозистої будови вимагає використання спочатку загальноприйнятої скрінгової ІГХ панелі з 4-х антитіл (пан-цитокератин, загальний лейкоцитарний антиген, виментин, S100), а також додаткових ІГХ панелей з гепатоцитарних маркерів (HepPar-1, α -FTP, гліпікана-3), цитокератинових (CK7, CK20), меланоцитарних (HMB45, тирозиназа), нейроендокринних (ChG, Syn, CD56,), рецепторно-гормональних (ER, Andr, PSA) маркерів, маммаглобіна, що застосовуються з урахуванням гістологічної структури виявленої пухлини.

Резюме.

Проведені комплексні патоморфологічні дослідження показали, що гепатоцелюлярному раку печінки притаманна значна варіабельність мікроструктури: у одного й того ж хворого може виявлятися декілька гістоархітектонічних патернів: трабекулярний, солідно-клітинний, ацинарний (або псевдозалозистий), циротичний, які не мають певної клінічної симптоматики і впорядкованого розподілу.

В трепанобіоптатах печінки у 17,8% хворих визначався фіброзний, циротичний і скірозний гепатоцелюлярний рак. У фіброзному варіанті гепатоцелюлярного раку печінки поміж скупченнями або рядами пухлинних клітин, оточених ледь помітними пухлинними синусоїдами з наявністю

малочисельних ендотеліальних клітин, виявляються значні прошарки фіброзу різної конфігурації, товщини і довжини.

Циротичний гепатоцелюлярний рак відрізняється переважанням над раковими клітинами надмірно розвинутої фіброзної стромі. За мікроскопічною будовою в трепанобіоптатах пухлини розрізняються два варіанта циротичного гепатоцелюлярного раку печінки: з наявністю гніздних скупчень атипових пухлинних гепатоцитів в надмірно розвинутій сполучній тканині, або з наявністю острівців з рясних пухлинних ацинарно-трабекулярних структур між надто широкими прошарками сполучної тканини.

В скірозовому варіанті гепатоцелюлярного раку в надмірно розвинутій фіброзній стромі визначаються поодинокі одно-двохклітинні ланцюги з пухлинних атипових гепатоцитів всередині вузьких синусоїдів, вистелених малочисельним сплосченим ендотелієм. На відмінність від скірозового варіанту холангіоцелюлярного раку, в пухлинних атипових гепатоцитах гепатоцелюлярного раку виявляється слабка експресія гепатоцитарного маркеру HerPar-1, а в ледь помітних синусоїдах навколо них виявляються CD31 і CD34 позитивні ендотеліальні клітини.

При патоморфологічному аналізі трепанобіоптатів пухлин визначено, що у G1 високодиференційованому гепатоцелюлярному раку виявляються класичні солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни. Помірно диференційований G2 гепатоцелюлярний рак представлений фіброзним і циротичним варіантами пухлини. Низько диференційований G3 і недиференційований G4 гепатоцелюлярний рак визначають скірозні, веретенноклітинні, поліморфноклітинні і гігантоклітинні варіанти пухлин та відсутність трабекулярних і ацинарних структур.

Виконані імуногістохімічні дослідження продемонстрували, що для гепатоцелюлярного раку характерним є імунофенотип HerPar 1 + | AFP + | CK7 +/- | CK8 + | CK19 +/- | CK20 +/- | CA125- | CA19-9 +/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-.

Застосування в імуногістохімічному аналізі гепатоцелюлярного раку панелі антитіл до HerPar-1, AFP, CK7, CK20 і маркерів вірусного гепатиту В (HbsAg, HbsAg) показало, що у 92,45% хворих виявляється цитоплазматична гранулярна експресія HerPar-1 пухлинними клітинами, які займають $49,35 \pm 25,45\%$ стандартизованої площі гістологічного зрізу гепатоцелюлярної пухлини. У 54,72% пацієнтів визначається високий рівень експресії Her Par-1 клітинами пухлини, у 22,64% хворих - помірний рівень експресії цього маркера, а у 15,09% пацієнтів - низький рівень експресії Her Par-1 клітинами гепатоцелюлярного раку печінки.

Поведені дослідження підтвердили діагностичну значимість HerPar-1 і α -фетопротейну в патоморфологічній діагностики гепатоцелюлярного раку печінки. Застосування імуногістохімічних методик показало, що 81,13% хворих гепатоцелюлярної карциномою в злоякісних клітинах визначається цитоплазматична і ядерна експресія α -фетопротейну, площа AFP-іммунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному раку печінки в середньому становить $37,25 \pm 5,47\%$. У 37,74% хворих виявляється високий рівень експресії α -фетопротейну клітинами гепатоцелюлярного раку, у 26,42% пацієнтів - помірний, у 16,97% хворих має місце низький рівень експресії α -фетопротейну пухлинними гепатоцитами.

Експресія CK7 пухлинними клітинами виявляється у 37,74% хворих на гепатоцелюлярний рак, CK7-іммунопозитивні клітини розподіляються в пухлини у вигляді осередкових скупчень і займають всього $21,08 \pm 5,19\%$ її площі. У 22,64% хворих визначається низький рівень експресії CK7 клітинами гепатоцелюлярного раку, у 10,37% хворих - помірний рівень експресії, у 4,73% хворих виявляється високий рівень експресії CK7 пухлинними клітинами.

Експресія CK20 клітинами гепатоцелюлярного раку визначається у 30,13% хворих, при цьому групи CK20-позитивних клітин складають $29,35 \pm 17,31\%$ стандартизованої площі гістологічного зрізу гепатоцелюлярного раку. Високий рівень експресії CK20 клітинами

гепатоцелюлярного раку виявлений у 19,74% хворих, помірний рівень експресії - у 4,93% пацієнтів, низький рівень експресії СК20 пухлинними клітинами виявлений у 5,46% хворих.

Між рівнями експресії клітинами гепатоцелюлярного раку AFP і HerPar-1 спостерігається прямий слабкий кореляційний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +0,25$). Між рівнями експресії пухлинними клітинами AFP і СК7, AFP та СК20 має місце пряма середньої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = +0,50$), а між рівнями експресії Her Par 1 і СК7, Her Par 1 і СК20 спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +1$).

Проведені дослідження показали, що у 100% хворих на гепатоцелюлярний рак в диференційованих і в низькодиференційованих пухлинних клітинах виявлена дифузно-гранулярна цитоплазматична і ядерна експресія HbcAg різної інтенсивності, у 82,0% пацієнтів виявлена різної інтенсивності експресія HbcAg в цитоплазмі пухлинних клітин. У хворих на Між рівнями експресії клітинами гепатоцелюлярного раку HBcAg і HBsAg спостерігається пряма сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = + 0,87$). Імуногістохімічний аналіз показав, що наявність HBcAg і HBsAg в пухлинних клітинах первинного раку печінки далеко не завжди збігається з експресією цих антигенів в гепатоцитах перифокальної тканини печінки. Виявлений значний рівень експресії HBsAg в пухлини у 55,17% хворих та значний рівень експресії HbcAg в пухлинної тканини у 74,0% хворих підтверджують важливу роль вірусу гепатиту В у розвитку гепатоцелюлярного раку печінки.

Проведений імуногістохімічний аналіз фіброламельярної карциноми показав, що в її пухлинних гепатоцитах визначається високий рівень експресії HerPar-1 і СК7, але пухлинні клітини AFP імунонегативні. На відміну від інших варіантів гепатоцелюлярної карциноми в клітинах фіброламельярної карциноми виявляється експресія маркерів біліарного диференціювання: епітеліального мембранного антигену і цитокератину 20.

За результатами імуногістохімічного дослідження встановлено, що у комбінованому гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярному раку у солідноклітинному й трабекулярному патернах визначається експресія HerPar -1, AFP і CK20, а в дуктулоподібному патерні – CK7 і CK19.

При порівняльному імуногістохімічному дослідженні визначено, що гепатоцелюлярний рак печінки, на відмінність від метастазів в печінку інших злоякісних пухлин солідно-клітинної та трабекулярної мікроструктури, характеризується високим рівнем експресії HerPar-1 та альфа-фетопротейну, відсутністю експресії муцинів MUC1, MUC5AC і CA125, а також варіабельною експресією CK8, CK7, CK19 і CK20, яка залежить від ступеня диференціювання й варіанта пухлини.

Метастази меланому в печінку солідно-трабекулярної мікроструктури, на відмінність від гепатоцелюлярного раку печінки, характеризуються експресією S100, HMB45, тирозинази, а також відсутністю експресії гепатоцитарних маркерів (HerPar-1, α -FTP).

Метастази в печінку нейроендокринних пухлин солідно-трабекулярної мікроструктури мають імуногістохімічний профіль S100 + / ChG + / Syn + / CD56 +, який відрізняє їх від первинного раку печінки, а також від метастазів у печінку інших пухлин. Метастази раку молочної залози можуть бути ідентифіковані за імунофенотипом CK7 + / CK20- / Er + / Mgl +, метастази раку передміхурової залози – за імунофенотипом CK7- / CK20- / Andr + / PSA+.

Метастази в печінку аденокарциноми шлунка та колоректального раку тубулярної та залозисто-ацинарної структури мають подібний імуногістохімічний профіль експресії CK20, CDX2, CA 19-9 і муцинів CA 125, MUC2 і MUC5AC, диференційне значення має відсутність експресії CK7 у метастазах колоректального раку і її наявність в метастазах аденокарциноми шлунка.

Для диференційної діагностики у трепанобіоптатах печінки подібних за імуногістохімічним профілем метастазів протокового раку підшлункової

залози, аденокарциноми шлунка та колоректального раку необхідні додаткові дані клініко-інструментальних досліджень пацієнтів (УЗД, комп'ютерної томографії, гастроскопії й колоноскопії).

Матеріалу розділу відображені у роботах [13, 15, 17, 33, 34, 36-39].

РОЗДІЛ 4

МІКРОСКОПІЧНА І ІМУНОГІСТОХІМІЧНА

ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНОГО РАКУ ПЕЧІНКИ

З трьох основних різновидів холангіокарцином, виділених на підставі їх топографічної локалізації (позапечінкова/дистальна, холангіокарцинома воріт печінки/пухлина Клатскіна, внутрішньопечінкова/периферична холангіокарцинома) гістологічними, гістохімічними, імуногістохімічними і морфометричними методами вивчений внутрішньопечінковий, мас-формуєчий холангіоцелюлярний рак.

4.1 Гістологічна характеристика холангіоцелюлярного раку печінки

Виконані нами гістологічні, гістохімічні і імуногістохімічні дослідження показали, що в трепанобіоптатах печінки внутрішньопечінковий мас-формуєчий холангіоцелюлярний рак характеризується наявністю трьох основних мікроскопічних патернів: тубулярного, залозисто-ацинарного та солідно-клітинного (інколи – гніздно-клітинного), розташованих в рясній десмопластичній стромі. Ознак продукції пухлинними клітинами жовчі не визначається.

В тубулярному патерні холангіоцелюлярного раку завжди визначається значна фібропластична строма, в якій розташовані один з двох різновидів пухлинних структур. В одних випадках виявляються гілкуваті дуктулярні структури з вузькими просвітами, вистеленими кубоїдальними та сплосченим епітелієм з еозинофільною чи амфіфільною цитоплазмою, округлими гіперхромними ядрами з майже непомітним ядерцем (рис.4.1). В других випадках виявляються тубулярні структури з наявними просвітами, вистеленими кубоїдальними клітинами з еозинофільною цитоплазмою, з округлими ядрами і майже непомітним ядерцем (рис.4,2).

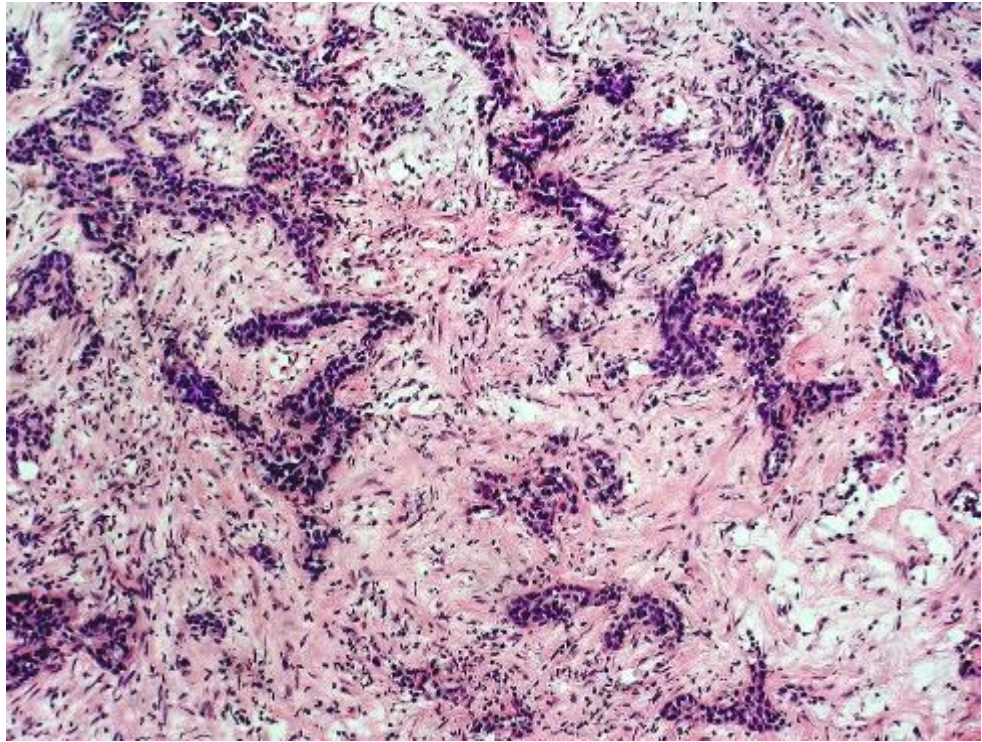


Рис. 4.1 Тубулярний патерн холангіоцелюлярного раку: гілкуваті дуктулярні структури з вузькими просвітами в рясній фібропластичній стромі. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

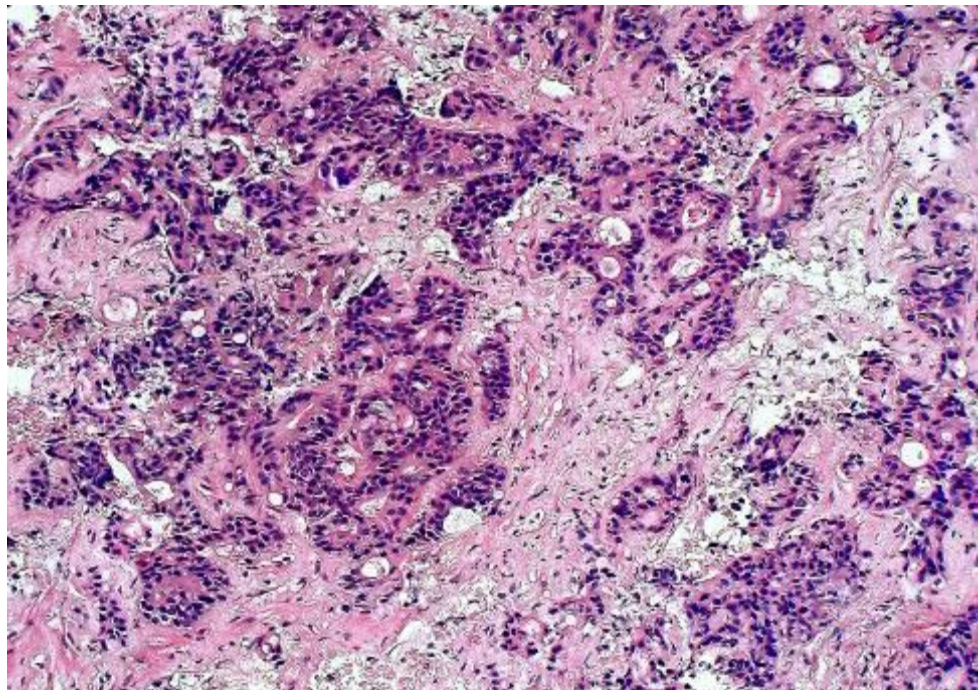


Рис. 4.2 Тубулярний патерн холангіоцелюлярного раку: в рясній фібропластичній стромі визначаються тубулярні структури з наявними просвітами, вистеленими кубоїдальними клітинами. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

В тубулярному патерні холагіоцелюлярного раку розрізняються пухлини різного ступеню гістологічного диференціювання. У високодиференційованій холагіоцелюлярній пухлині тубулярні структури вистелені одним рядом майже однакових кубоїдальних клітин з крупними гіперхромними ядрами і непомітним ядерцем. У помірнодиференційованій холагіоцелюлярній пухлині в тубулярних структурах визначається однорядний поліморфний пухлинний епітелій, поряд з кубоїдальними клітинами спостерігається значний домішок сплосчених клітин біліарного типу з гіперхромними ядрами (рис.4.3). У низькодиференційованому холагіоцелюлярному раку в дрібних тубулярних структурах виявляються вкрай поліморфні за формою і розмірами пухлинні клітини з еозинофільною або амфільною цитоплазмою і поліморфними гіперхромними ядрами і непомітними ядерцями (рис.4.4). Визначається інвазія поліморфних клітин через базальну мембрану тубулярних структур в прилеглу фібропластичну строму.

Залозисто-ацинарний патерн холагіоцелюлярного раку також розташовується в рясній фібропластичній стромі. В такому патерні раку визначаються округлі залозистоподібні структури або розгалуджені ацинарні структури, сформовані стовпчастим, високопризматичним або циліндричним пухлинним епітелієм з гіперхромними овально-протяжними гіперхромними ядрами без помітних ядерць (рис.4.5, 4.6). Залозистоподібні і ацинарні структури холагіоцелюлярного раку вистелені багаторядним (рис.4.5), двох-трьохрядним (рис.4.6), або переважно однорядним стовбчастим пухлинним епітелієм. В деяких крупних ацинарних мікроструктурах визначаються кріброзні утворення та папілярні вирости з пухлинних клітин. Фібропластична строма холагіоцелюлярного раку помірної клітинності, містить поодинокі пучин-продукуючі клітини та значну кількість сполучнотканинних волокон, які забарвлюються за Ван Гізон та трихромним методом Масона.

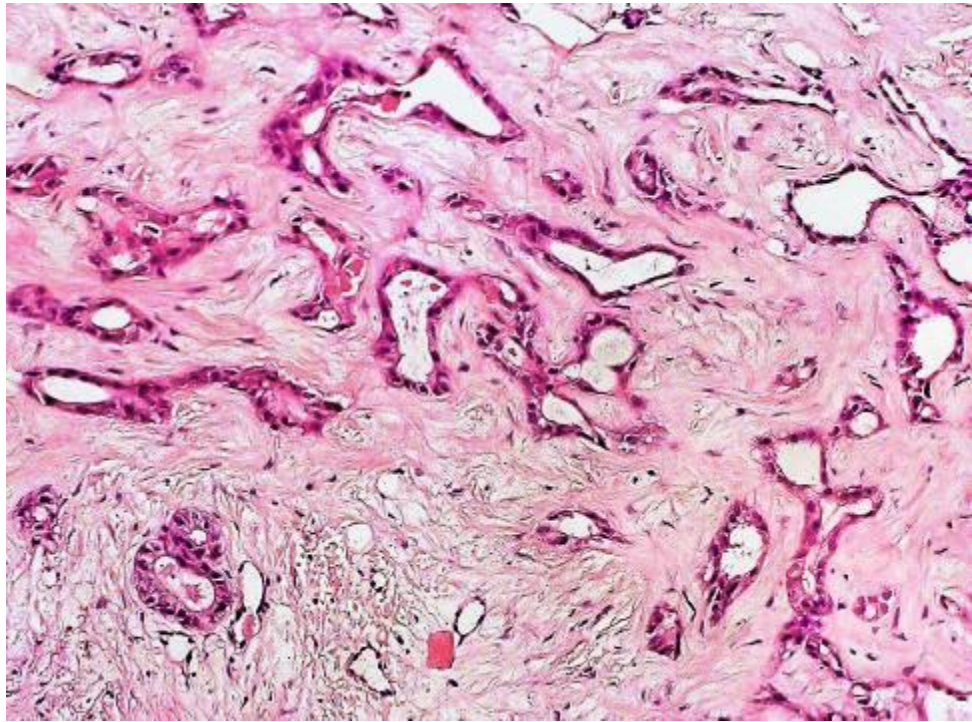


Рис. 4.3 Помірно диференційований холагіоцелюлярний рак з тубулярних структур в рясній фібропластичній стромі. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

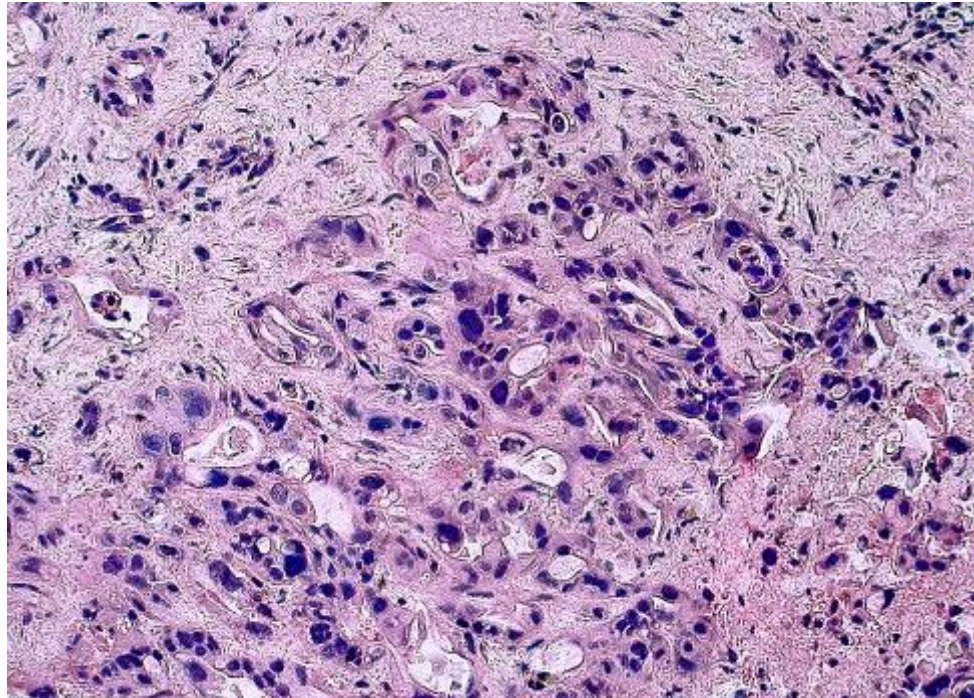


Рис. 4.4 Низько диференційований холагіоцелюлярний рак з тубулярних структур в фібропластичній стромі. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

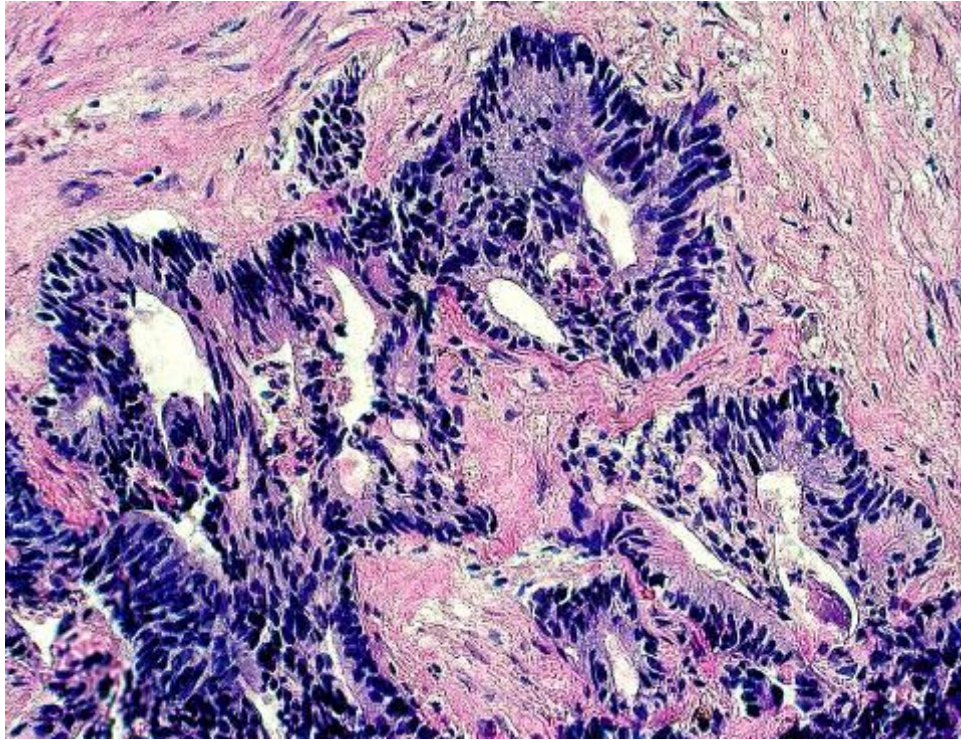


Рис. 4.5 Залозисто-ацинарний патерн холагіоцелюлярного раку печінки в рясній фібропластичній стромі з наявністю муцин-продукуючих клітин з голубою цитоплазмою. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

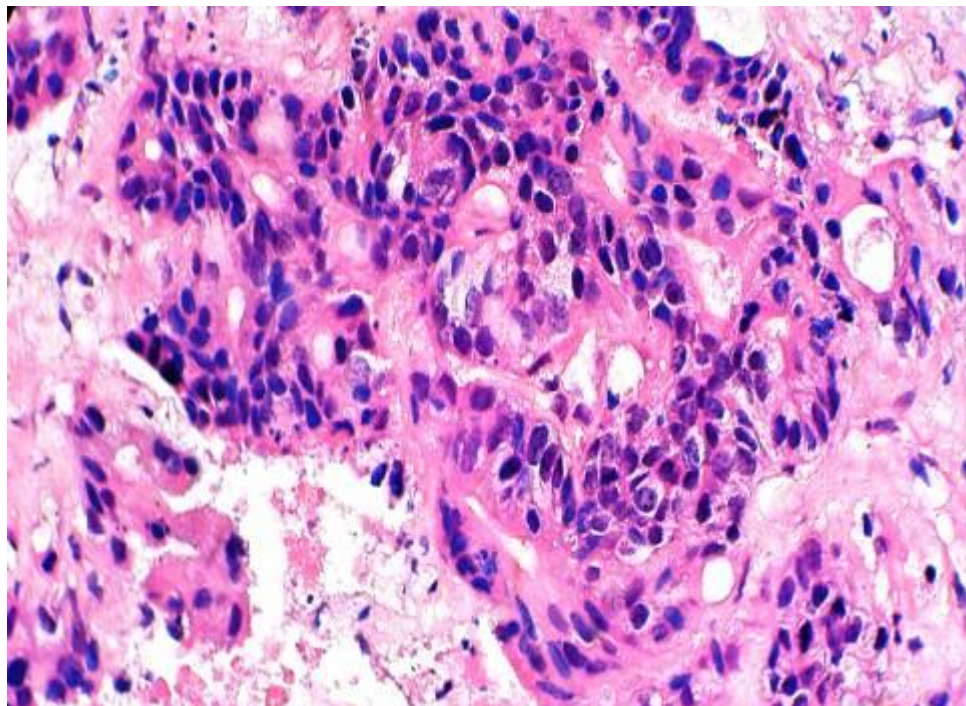


Рис. 4.6 Залозистоподібний патерн холагіоцелюлярного раку печінки в рясній фібропластичній стромі. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

В деяких ділянках пухлини в фібропластичній стромі утворюються осередки з тісно прилеглих одна до одної залозистоподібних і ацинарних структур, які за своєю мікроструктурою нагадують звичайну аденокарциному (рис.4.7). На межі тканини печінки і пухлини в фібропластичній стромі холагіоцелюлярного раку поміж його залозистоподібними і ацинарними структурами нерідко визначаються дифузна клітинна інфільтрація з ліфоцитів та домішкою нейтрофільних і еозинофільних лейкоцитів.

За мікроскопічною будовою залозистоподібних і ацинарних структур, виразністю фібропластичної стромі поміж ними та наявністю/відсутністю інвазії розрізняється холангіоцелюлярний рак помірного і низького ступеню диференціювання. У помірнодиференційованому холагіоцелюлярному раку залозистоподібні і ацинарні структури вистелені переважно одно-двохрядним високопризматичним або циліндричним пухлинним епітелієм, вони зближені між собою і розділені вузькими сполучнотканинними прошарками, інвазія пухлинного епітелію в фібропластичну строму відсутня (рис.4.7). У низькодиференційованому холагіоцелюлярному раку залозистоподібні і ацинарні структури вистелені багаторядним поліморфним високопризматичним і циліндричним пухлинним епітелієм, який утворює пухлинні мікропапілярні і криброзні структури; ацинарні і залозистоподібні структури зближені між собою, визначаються вогнища інвазії пухлинного епітелію через базальні мембрани в фібропластичну строму (рис.4.8).

Солідно-клітинний і гніздно-клітинний патерни притаманні холангіоцелюлярному раку низького ступеню диференціювання. Гніздно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку утворюють в фібропластичній стромі скупчення кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних пухлинних клітин з гіперхромними ядрами, оточеними вузьким обідком цитоплазми (рис.4.9). Солідно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку являє собою поширені ділянки тісно прилеглих одна до одної кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних пухлинних клітин з гіперхромними ядрами, оточеними вузьким обідком цитоплазми (рис.4.10).

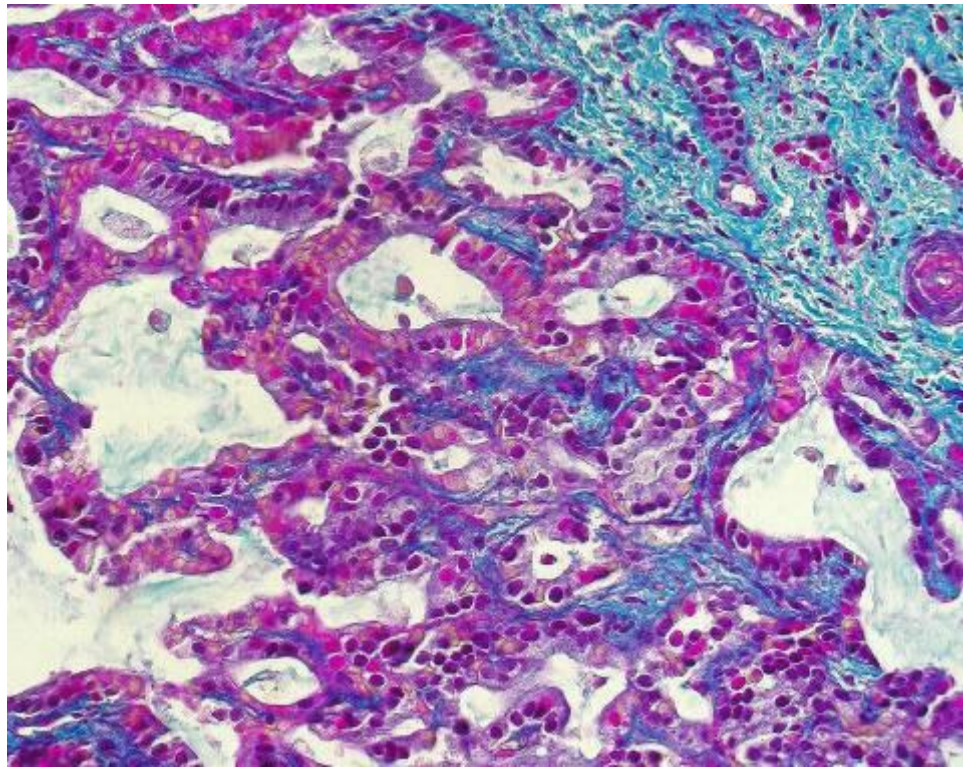


Рис. 4.7 Помірно диференційований холагіоцелюлярний рак із залозистоподібними і ацинарними структурами в фібропластичній стромі. Забарвлення Масон-триколор. Зб. х 150.

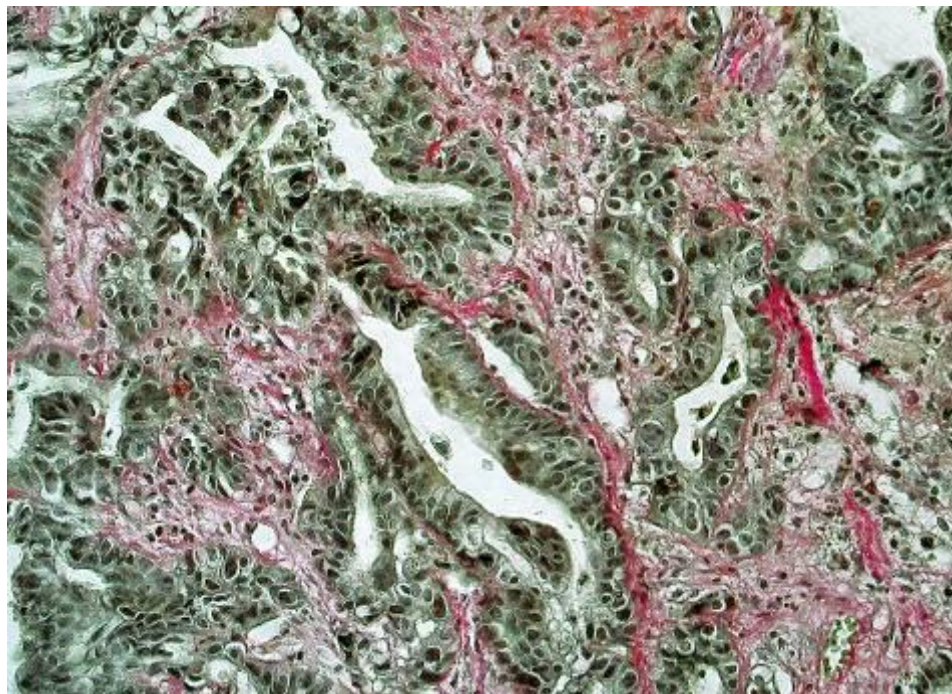


Рис. 4.8 Низько диференційований холагіоцелюлярний рак із залозистоподібними і ацинарними структурами в фібропластичній стромі. Забарвлення за Ван Гізон. Зб. х 400.

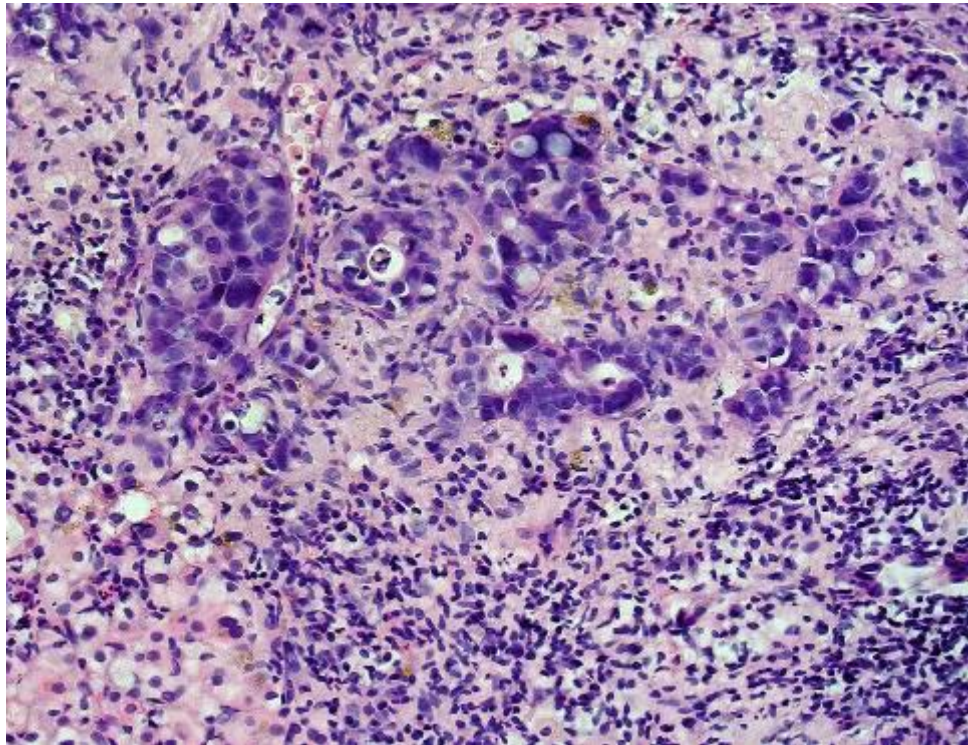


Рис. 4.9 Гніздно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку печінки в фібропластичній стромі. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 250.

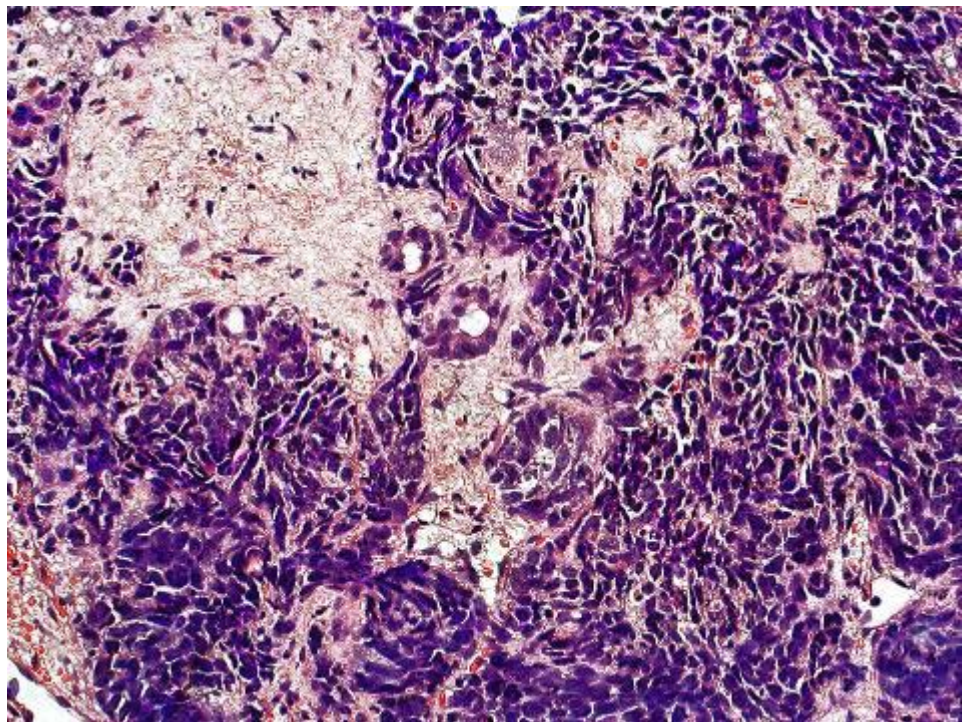


Рис. 4.10 Солідно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку печінки в фібропластичній стромі. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

Про те, що такі солідно-гніздні клітинні скупчення є компонентом холагіоцелюлярного раку, свідчить наявність біля них дрібних тубулярно-дуктулярних пухлинних структур (рис.4.11,4.12). Поширені солідні скупчення пухлинних клітин розташовуються в фібропластичній стромі, (рис.4.11.,4.12), інколи від них відшнуровуються дрібні дуктулярні і тубулярні структури, або ацинарно-залозисті пухлинні структури (рис.4.12.).

Скірозний варіант холангіоцелюлярного раку відрізняється переважанням фібропластичної стромі над малочисельними пухлинними тубулярними або дуктулярними структурами (рис.4.13). В одних зонах в фібропластичній стромі виявляються скупчення з двох-трьох кубоїдальних клітин з крупними гіперхромними ядрами та короткі дрібні дуктули з аналогічними клітинами в отворах (рис.4.14А), в інших зонах визначаються одно-двохклітинні ланцюги кубоїдальних клітин у вузьких отворах дрібних дуктул, або тубулярно-дуктулярні структури з відокремленими від базальних мембран кубоїдальними пухлинними клітинами (рис.4.14Б). В поширеній фібропластичній стромі також спостерігаються тубулярні структури, вистелені сплосченим пухлинним епітелієм з дистрофічними змінами (рис.4.13), В фібропластичній стромі нерідко визначаються клітини з муцинами в цитоплазмі, а також дрібні вогнища муцинозного ослизнення (рис.14А). Необхідно відзначити, що в трепанобіоптаті печінки з обмеженим об'ємом діагностичного матеріалу скірозний варіант холангіоцелюлярного раку без наявності тубулярно-дуктулярних структур за мікроскопічними ознаками мало чим відрізняється від скірозного варіанту гепатоцелюлярного раку. Низки або дрібні скупчення кубоїдальних клітин з крупними гіперхромними ядрами холангіоцелюлярного раку мікроскопічно дуже схожі з низками або дрібними скупченнями кубоїдально-овальних клітин гепатоцелюлярного раку. Вирішальне значення в дифереційній діагностиці належить ІГХ дослідженням. На відмінність від скірозного варіанту гепатоцелюлярного раку в скірозній холангіоцелюлярній пухлині в кубоїдальних клітинах визначається цитоплазматична експресія СК7 та.

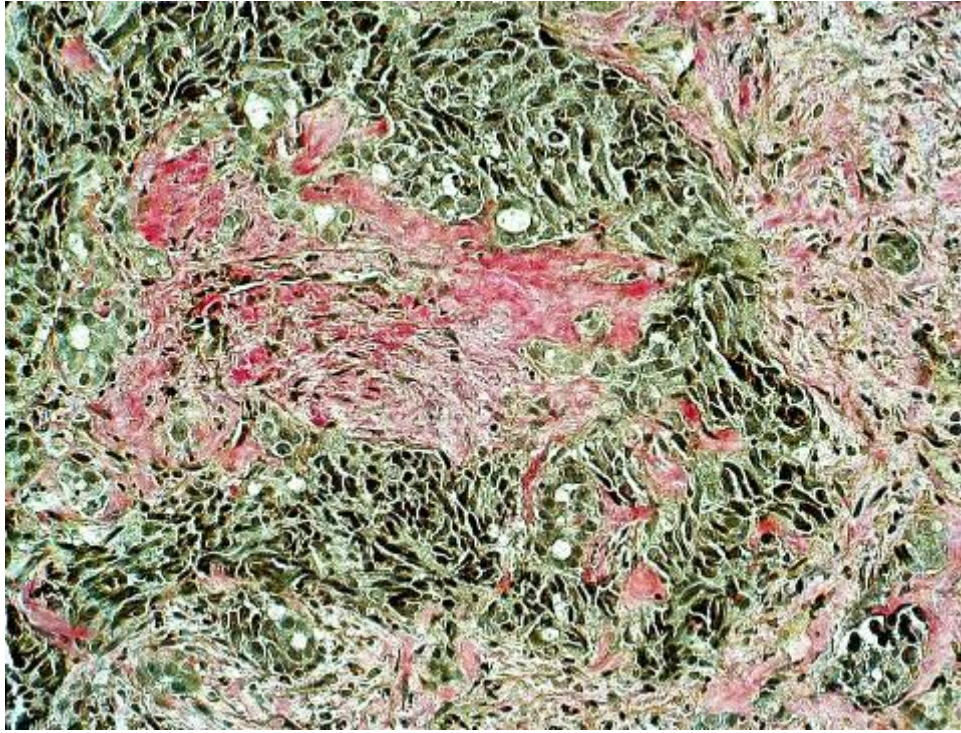


Рис. 4.11 Солідно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку печінки в фібропластичній стромі. Забарвлення за Ван Гізон. Зб. х 150.

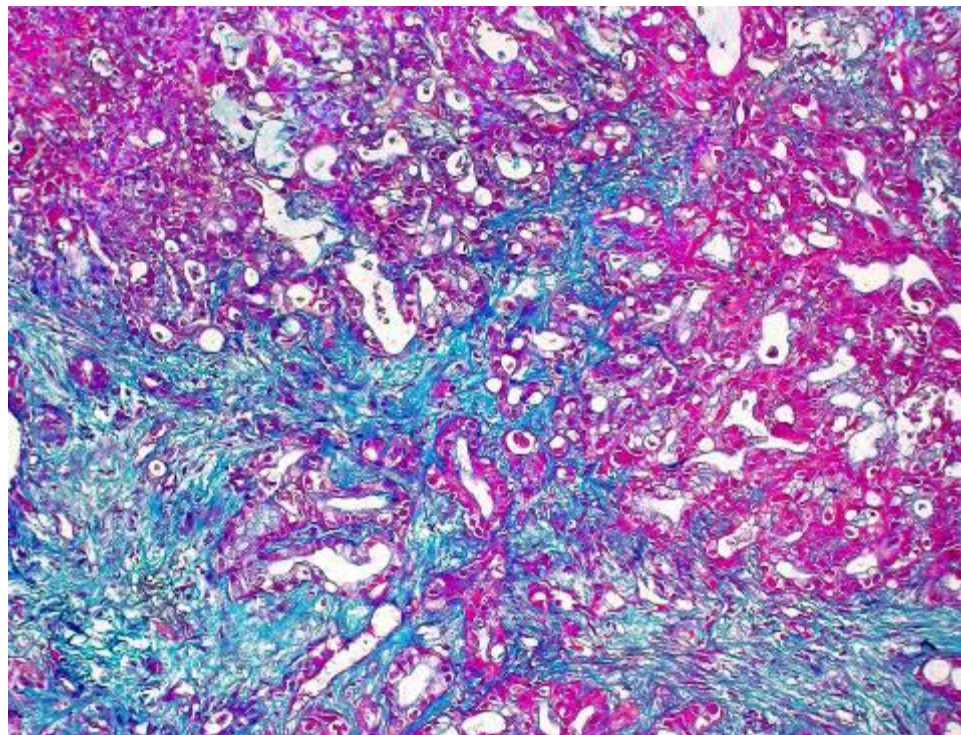


Рис. 4.12 Солідно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку печінки (зверху зліва), від якого відшнуровуються залозистоподібні структури. Забарвлення Масон триколор. Зб. х 150.

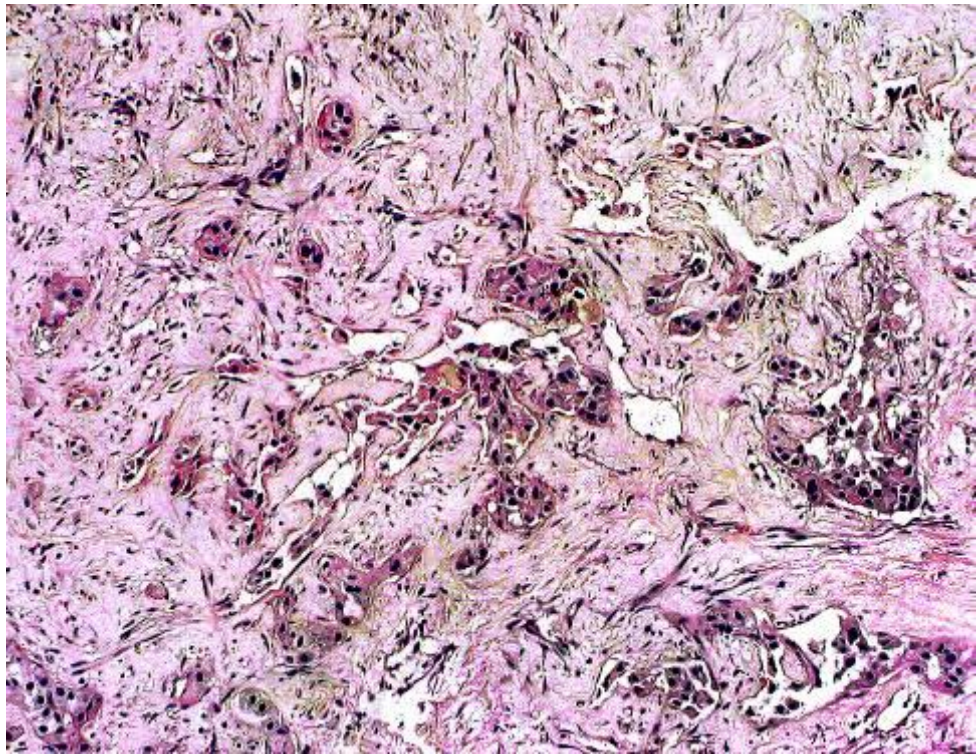


Рис. 4.13 Скірозний варіант холангіоцелюлярного раку печінки. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. x 150.

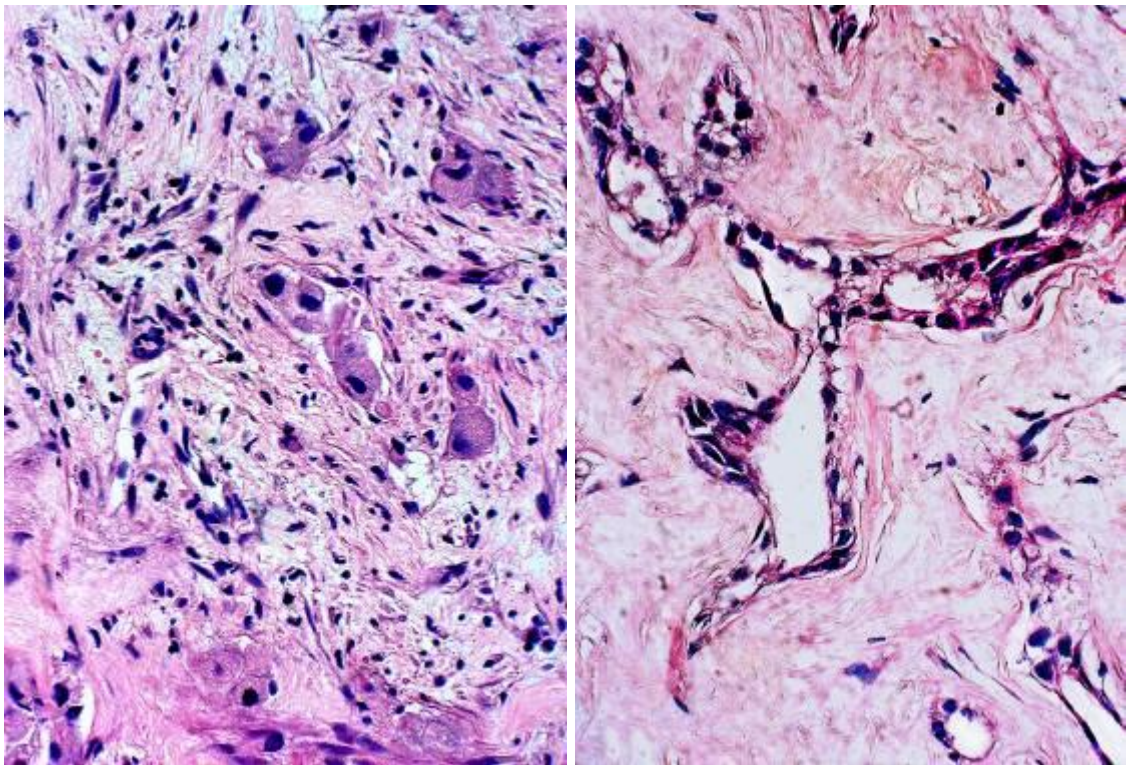


Рис. 4.14 А,Б. Скірозний варіант холангіоцелюлярного раку печінки. Скупчення з двох-трьох кубодальних клітин (А) та тубулярні структури з дистрофією пухлинного епітелію Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: А і Б x 500.

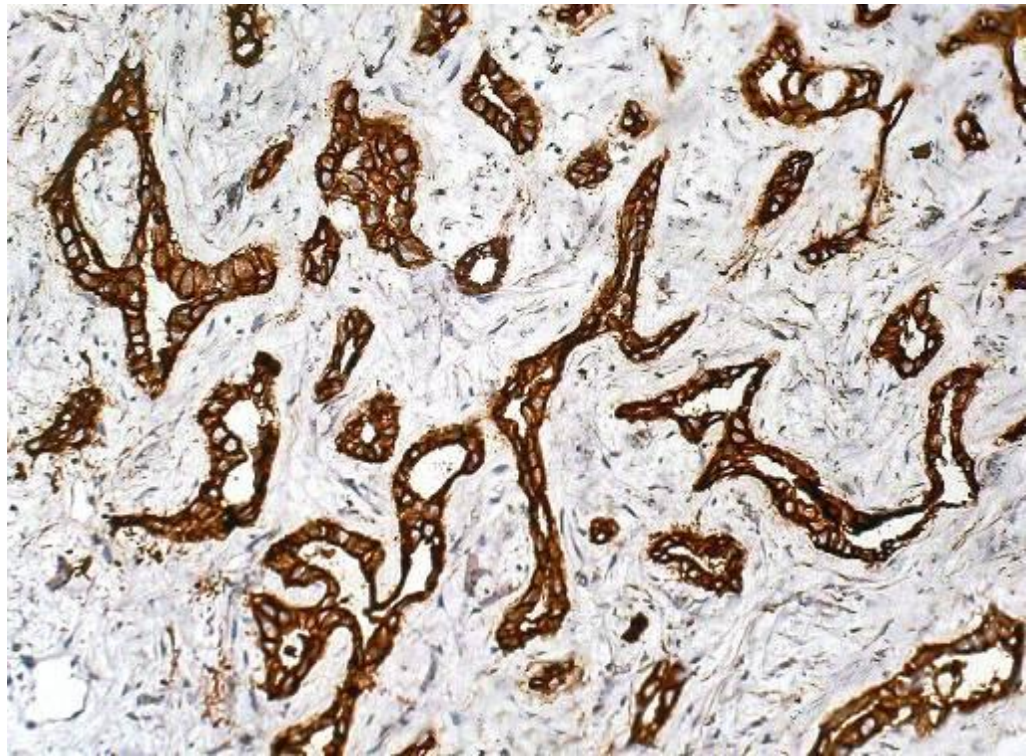
відсутня експресія HerPar-1, ці клітини оточені базальною мембраною, в якій не має CD31-позитивних або CD34-позитивних ендотеліальних клітин

4.2 Імуногістохімічна характеристика холангіоцелюлярного раку печінки

Імуногістохімічні особливості холангіоцелюлярного раку вивчені в трепанобіоптатах печінки 36 хворих шляхом визначення особливостей експресії клітинами раку таких маркерів як CK7, CK20, HerPar-1, AFP, HbsAg і HbcAg, а також визначення в мікропрепаратах площ, яку займали в зрізах пухлини відповідні імунопозитивні клітини. При диференційній діагностиці холангіоцелюлярного раку з метастазами в печінку інших злоякісних пухлин вибірково визначали експресію CA125, CA19, CDX2, MUC1, MUC5AC.

Дослідження експресії HerPar-1 показало, що на відмінність від високої експресії цього маркера в гепатоцелюлярному раку печінки, в клітинах холангіоцелюлярного раку позитивна експресія HerPar-1 не визначається.

При дослідженні експресії цитокератинів 7 і 20 клітинами ХЦР нами було встановлено наступне. На відмінність від гепатоцелюлярного раку, позитивна цитоплазматична експресія CK7 пухлинними клітинами холангіоцелюлярного раку виявлена у 97,22% хворих. При цьому в 58,33% спостережень ХЦР визначається високий рівень експресії CK7, який склав $114,03 \pm 11,53$ УООЩ (Рис 4.15), у 30,56% хворих виявлено помірний рівень експресії ($71,06 \pm 14,68$ УООЩ), в 8,33 % випадків рівень експресії CK7 пухлинними клітинами був слабким ($43,32 \pm 6,71$ УООЩ), а у 2,78% пацієнтів дуже низький рівень експресії CK7 в пухлині ($10,99 \pm 3,71$ УООЩ) був визнаний негативним. Слід зазначити, що CK7-позитивні клітини з різним рівнем експресії цього цитокератину нерівномірно розподілені в злоякісній холангіоцелюлярній пухлині (Рис 4.16). За результатами проведеної цифрової морфометрії встановлено, що CK7-імунопозитивні клітини займають в ХЦР $43,55 \pm 9,93\%$ СПГЗ.



4.15 Високий рівень цитоплазматичної експресії цитокератину 7 клітинами холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Cytokeratine 7, Clone OV-TL 12/30*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. х 650.

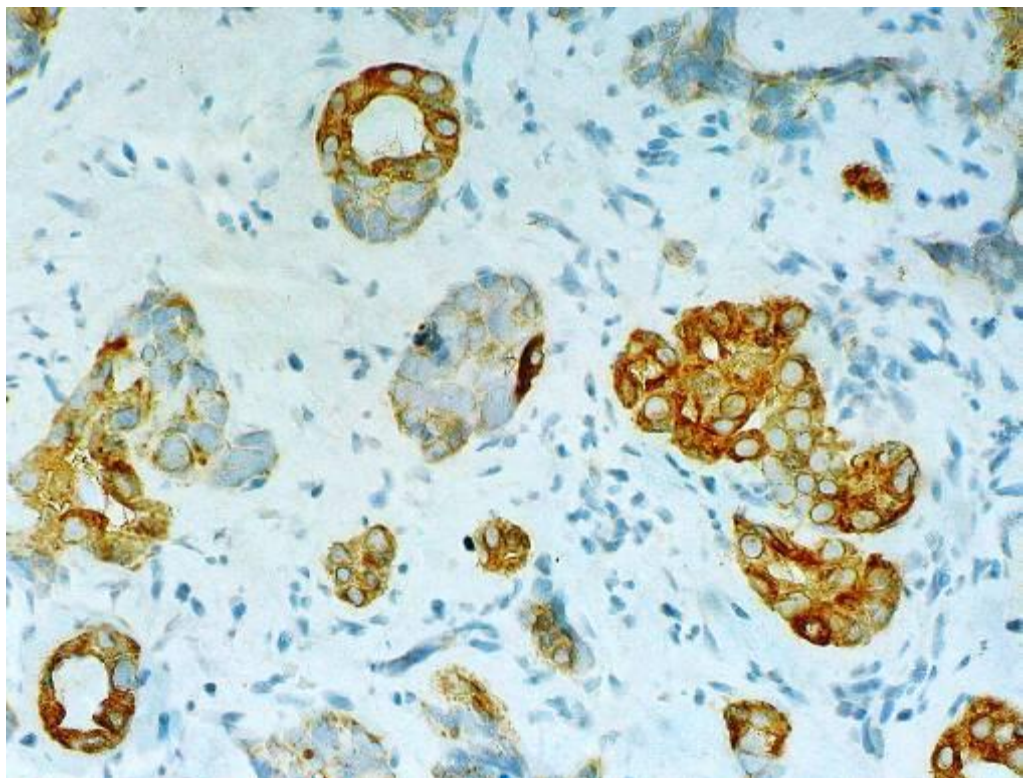


Рис.4.16 Нерівномірний розподіл СК7-позитивних клітин з різним рівнем експресії цитокератину 7 в холангіоцелюлярному раку. *Mo a-Hu Cytokeratine 7, Clone OV-TL 12/30*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. X 650

За даними виконаного нами імуногістохімічного аналізу встановлено, що менш ніж у половини хворих на холангіоцелюлярний рак (у 45,29% спостережень) виявляється позитивна цитоплазматична експресія СК20 пухлинними клітинами, у 54,71% хворих на холангіоцелюлярний рак експресія СК20 в пухлині була негативною (склала всього $8,51 \pm 2,89$ УООЩ). Високий рівень експресії СК20 ($115,15 \pm 13,69$ УООЩ) визначений в 24,27% випадків, у 11,17% хворих виявлено помірний рівень експресії цього цитокератину, який склав $81,76 \pm 16,48$ УООЩ, у 9,85% хворих експресія СК20 в ХЦР була слабкою і складала $33,32 \pm 7,61$ УООЩ (рис.4.17). За даними фотоцифрової морфометрії СК20-іммунопозитивні клітини з різним рівнем експресії цього цитокератину в середньому займали половину ($50,28 \pm 16,35\%$) СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки. Взагалі, експресія СК20 клітинами холангіоцелюлярного раку визначається частіше, ніж у гепатоцелюлярному раку, і середня площа СК20-позитивних клітин в холангіоцелюлярному раку вдвічі більша, ніж у гепатоцелюлярному раку.

Проведені нами імуногістохімічні дослідження показали, що у 47,22% хворих на холангіоцелюлярний рак у злоякісних клітинах виявляється помірна та низька цитоплазматична і ядерна експресія α -фетопроतेїну. AFP-іммунопозитивні клітини в холангіоцелюлярному раку розподілялись дуже нерівномірно (рис.4.18), за даними фотоцифрової морфометрії площа, яку займали AFP-іммунопозитивні клітини, становила всього $17,25 \pm 9,67\%$ загальної площі клітин холангіоцелюлярного раку.

При поглибленому аналізі експресії α -фетопроतेїну клітинами холангіоцелюлярного раку встановлено, що у 27,78% хворих рівень експресії цього глікопротеїну був помірним і становив $68,51 \pm 15,09$ УООЩ, у 19,44 пацієнтів він був низьким ($34,62 \pm 10,51$ УООЩ), у 52,78% хворих занадто низький рівень експресії α -фетопроतेїну клітинами холангіоцелюлярного раку, що становив $6,51 \pm 2,87$ УООЩ був розцінений як негативний.

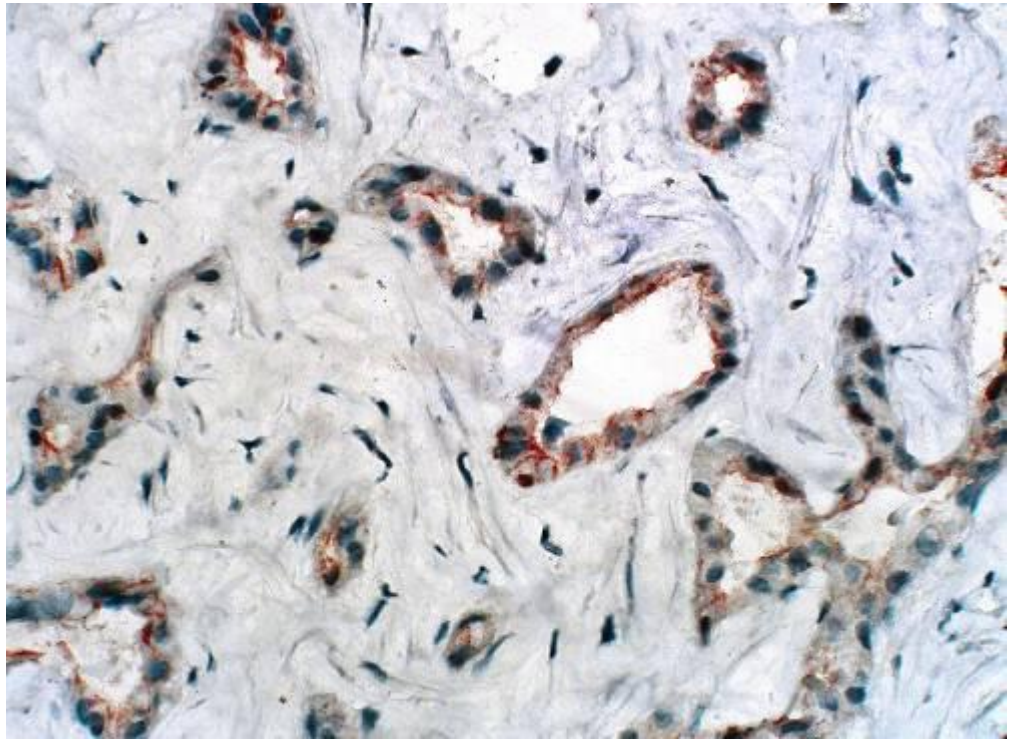


Рис. 4.17 Слабкий рівень експресії СК20 клітинами холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Cytokeratine 20, Clone Ks20.8*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. X 400

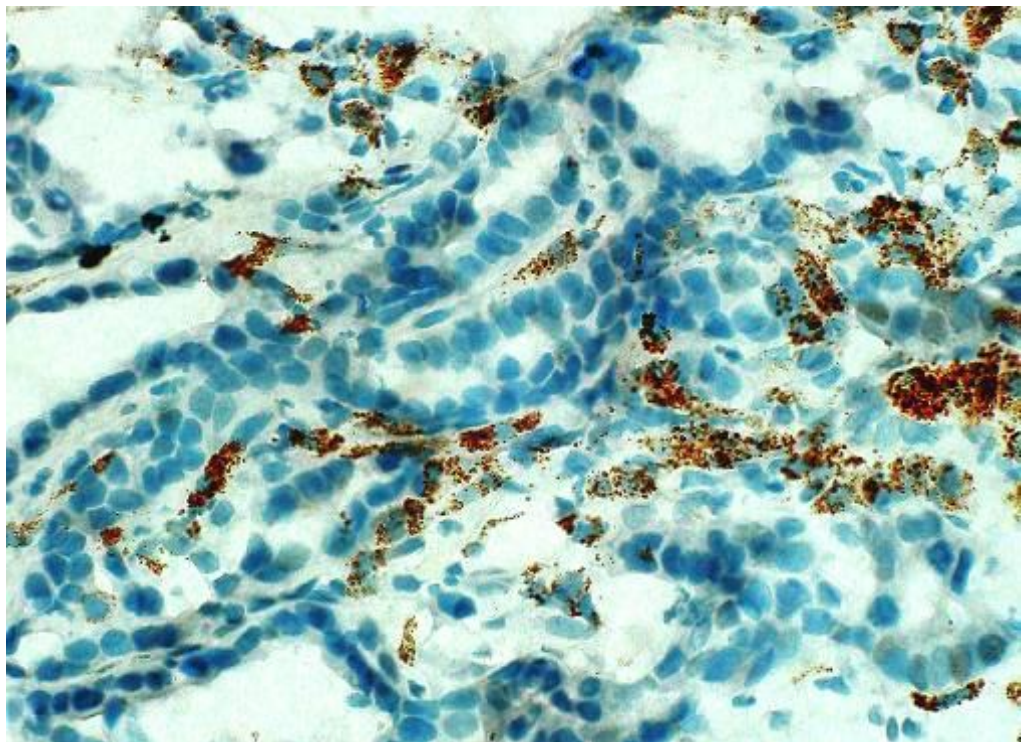


Рис.4.18 Нерівномірний розподіл в холангіоцелюлярному раку AFP-іммунопозитивних клітин з високим рівнем експресії AFP. *Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. x 650.

Проведений кореляційний аналіз показав, що у хворих на ХЦК між рівнем експресії СК7 і СК20 пухлинними клітинами спостерігається негативна слабкої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = -0,1$). Між рівнем експресії AFP і СК7 спостерігається пряма середньої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = +0,5$). Між рівнем експресії AFP і СК20 спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +1$). Рівні експресії AFP, СК7, СК20, HepPar-1 і кореляційні взаємозв'язки між ними в ХЦК наведені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Рівні експресії AFP, СК7, СК20, HepPar-1 і кореляційні взаємозв'язки між ними в холангіоцелюлярном раку печінки

Характеристика рівня експресії	Холангіоцелюлярний рак			
	AFP(A)	СК7 (B)	СК20(C)	Hep Par 1(D)
Середній рівень експресії %	37,88±25,23	40,73±25,23	50,28±16,35	0
p	<0,05			
r_{A-B}		0,5		
r_{A-C}			1	
r_{B-C}		-0,1		

Проведені імуногістохімічні дослідження показали, що в цитоплазмі диференційованих і в недиференційованих клітин холангіоцелюлярного раку, також у одиничних фібробластоподібних клітинах фібропластичної строми спостерігається дифузно-гранулярна експресія HBsAg різної інтенсивності, а в ядрах і в цитоплазмі - визначається дифузно-гранулярна експресія HBcAg різної інтенсивності. Результати ІГХ досліджень біоптатів печінки 37 хворих холангіоцелюлярним раком (2 з яких раніше страждали ХВГ С, 1 хворів на хронічний вірусний гепатит В + С; у інших онкохворих, згідно клінічних даних, вірусного гепатиту в анамнезі не було) показали, що у 43,25% пацієнтів в клітинах пухлини виявлялася цитоплазматична експресія HbsAg. Значний рівень експресії HBsAg клітинами холангіоцелюлярного раку

(наявність в пухлині 67-100% іммунопозитивних клітин) визначається у 27,73% хворих, помірний (наявність 34-66% іммунопозитивних клітин) - у 10,37% пацієнтів, слабкий рівень експресії (наявність 1-33% іммунопозитивних клітин) - у 5,15% хворих. Інтенсивність ІГХ реакції з HBsAg в клітинах холангіоцелюлярного раку була слабкою у 10,36% хворих, помірною – у 8,92% пацієнтів і вираженою - у 23,97% хворих.

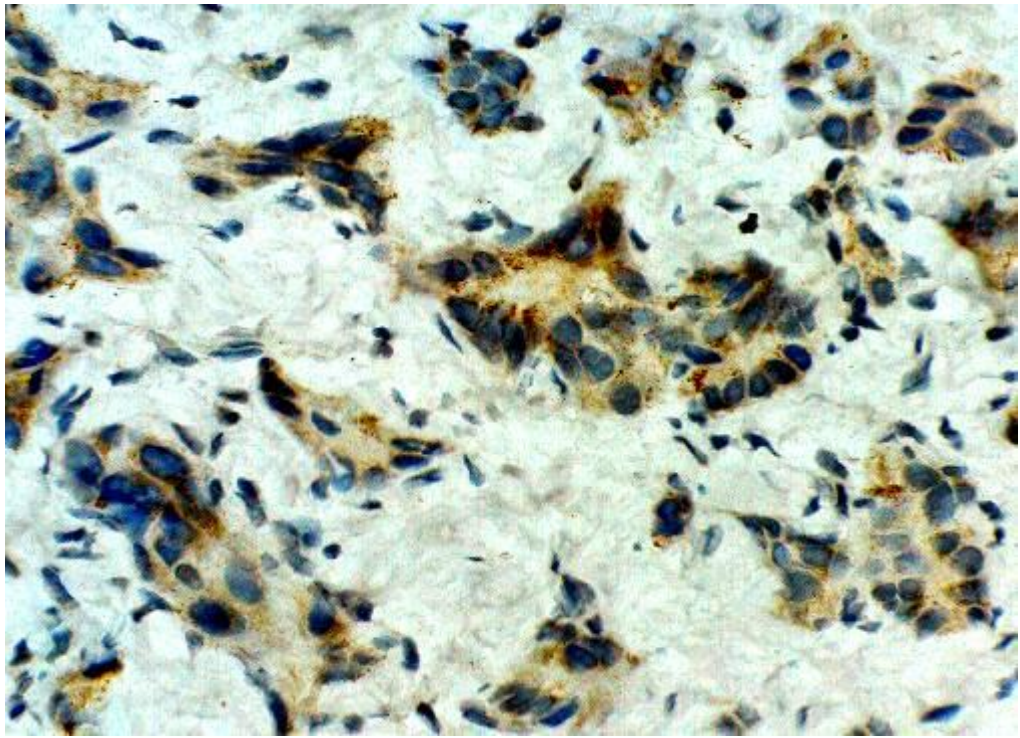
У 72,97% хворих в клітинах холангіоцелюлярного раку виявляється цитоплазматична і ядерна експресія HbcAg. У 40,22% хворих має місце значний рівень експресії HBcAg з наявністю в пухлині 67-100% іммунопозитивних клітин (рис.4.19), у 12,75% пацієнтів - помірний (наявність в пухлині 34-66% іммунопозитивних клітин), у 20% хворих - слабкий рівень експресії (наявність 1-33% іммунопозитивних клітин). Слабка інтенсивність ІГХ реакції з HBcAg в клітинах холангіоцелюлярного раку виявляється у 11,48% хворих, помірна - у 11,49% пацієнтів (рис.4.20) і виражена - у 50% хворих. Середній рівень експресії HBcAg клітинами холангіоцелюлярного раку склав $41,83 \pm 32,86\%$, що достовірно більше, ніж середній рівень експресії HbsAg, який склав $26,43 \pm 35,52\%$ ($p < 0,05$).

При кореляційному аналізі встановлено, що у хворих на холангіоцелюлярний рак спостерігається прямий сильний зв'язок між рівнем експресії клітинами пухлини HBcAg і HBsAg (коефіцієнт Пірсона $r = +0,82$) (табл.4.2).

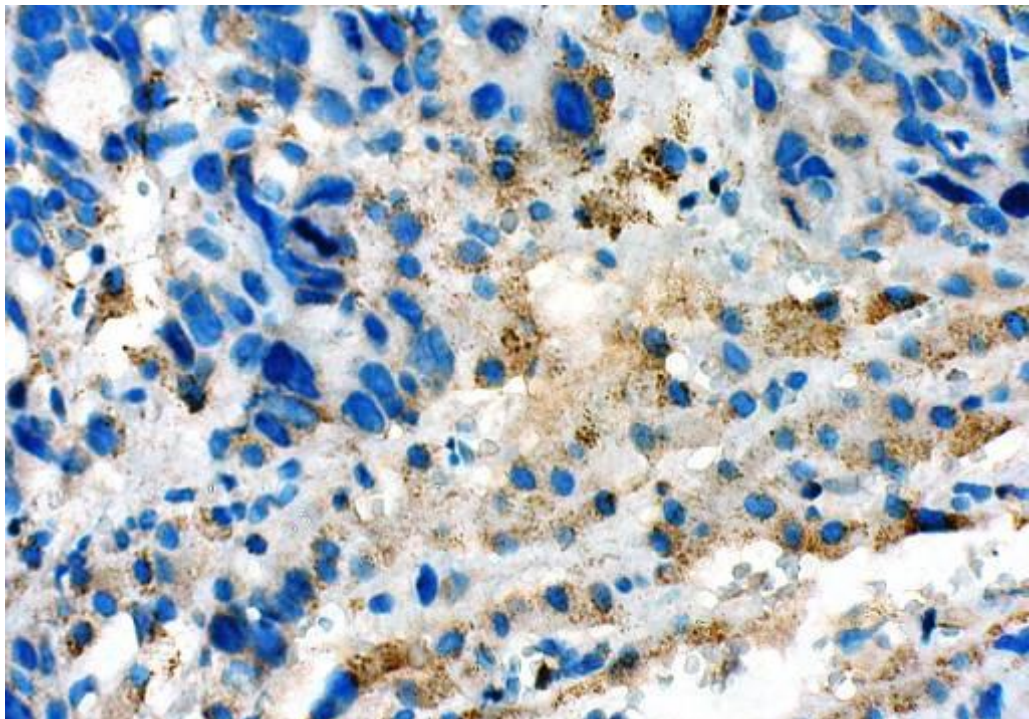
Таблиця 4.2

Аналіз рівня експресії HBcAg и HBsAg у хворих на холангіоцелюлярний рак

Характеристика рівня експресії HBcAg и HBsAg	Холангіоцелюлярний рак	
	HbcAg (A)	HbsAg (B)
Середній рівень експресії %	41,83±32,86	26,43±35,52
p	<0,05	
r_{A-B}	+0,82	



4.19 Значний рівень експресії HBsAg в цитоплазмі клітин холангіоцелюлярного раку раку. *Anti-HBsAg*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. х 650.



4.20 Помірна і слабка експресія HBsAg в цитоплазмі пухлинних клітин холангіоцелюлярного раку і в прилеглих гепатоцитах. *Anti-HBsAg*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. х 650.

4.3 Диференційна імуногістохімічна характеристика холангіоцелюлярного раку та метастазів в печінку інших пухлин тубулярної і залозисто-ацинарної структури

Проведені патоморфологічні дослідження показали, що при мікроскопічній діагностиці трепанобіоптатів печінки з клінічним діагнозом «рак печінки-?, метастаз в печінку злоякісної пухлини іншої первинної локалізації-?», коли в пухлині виявляється солідно-клітинний і гніздно-клітинний патерни в фіброзній стромі без наявності ацинарних та трабекулярних структур, характерних для холангіоцелюлярного раку, і тубулярних та залозисто-ацинарних структур, притаманних гепатоцелюлярному раку, виникає необхідність визначення генезу первинного раку печінки з урахуванням даних ІГХ аналізу. З другого боку, складною є диференційна мікроскопічна діагностика в трепанобіоптаті печінки холангіоцелюлярного раку печінки і метастазів в печінку протокового раку підшлункової залози (ПЗ), які мають тубулярну і залозистоподібно-ацинарну мікроструктуру і значно виражену фібропластичну строму, а в клінічному діагнозі фігурує «рак печінки-?, метастаз в печінку раку підшлункової залози-?».

Для диференційної діагностики первинних і метастатичних пухлин печінки ми застосували ІГХ маркування клітин гепатоцитарної (HerPar 1, AFP) або панкреатичної (CA19-9, CA125, CDX2) належності, визначали цитокіновий профіль цих пухлин у мінімальній панелі (CK7,8,19,20), а також визначали експресію пухлинними клітинами муцинів (MUC1, MUC5AC).

Результати проведеної нами в трепанобиопсіях печінки ІГХ диференційної діагностики солідно-клітинного і гніздно-клітинного гепатоцелюлярного раку з фіброзом-цирозом стромы, холангіоцелюлярного раку печінки, і метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози наведені в таблиці 4.3.

Імуногістохімічна характеристика холангіоцелюлярного раку печінки, гепатоцелюлярного раку, а також метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози

Тип пухлини	Експресія маркера										
	<i>Hep Par 1</i>	<i>AFP</i>	<i>CK7</i>	<i>CK8</i>	<i>CK 19</i>	<i>CK 20</i>	<i>CA 125</i>	<i>CA 19-9</i>	<i>CDX 2</i>	<i>MUC 1</i>	<i>MUC 5AC</i>
Гепатоцелюлярний рак печінки (n=23)	+	+	+/-	+	-/+	+/-	-	-/+	-	-	-
Холангіоцелюлярний рак печінки (n=15)	-	+/-	+	-/+	+	+/-	+	+	+/-	+	+
Метастаз протокового раку підшлункової залози (n=12)	-	-	+	-/+	+	-	+	+	+/-	+	+

Дані, наведені в таблиці 3.4, показують, що на відмінність від холангіоцелюлярного раку, ГЦР печінки характеризується високим рівнем експресії пухлинними клітинами *HepPar 1* і альфа-фетопротеїну, відсутністю експресії муцинів (*MUC1-*, *MUC5AC-*) і онкопротеїна *CA125*, а також варіабельною експресією цитокератинів (*CK8*, *CK7*, *CK19*, *CK20*), залежною від ступеня диференціювання пухлини. В ГЦР поряд солідно-клітинними і гніздно-клітинними скупченнями в фіброзній стромі ніколи не виявляються тубулярні або дуктулоподібні структури. На відмінність від ХЦР, для ГЦР характерним є імунофенотип *HepPar 1 + | AFP + | CK7 +/- | CK8 + | CK19 +/- | CK20 +/- | CA125- | CA19-9 +/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-*.

У низькодиференційованому ХЦР в трепанобіоптатах печінки поряд солідно-клітинними і гніздно-клітинними скупченнями в фібропластичній стромі спостерігаються рідкі, поодинокі дуктулоподібні структури (див.рис.4.10, 4.11). В препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, в фібропластичній стромі ХЦР можуть виявлятися поодинокі муцин-продукуючі клітини (див.рис.4.5) або дрібні вогнища муциноподібного озлизнення стромі. У низькодиференційованому ХЦР в пухлинних клітинах визначається різної інтенсивності цитоплазматична експресія *CA 19-9* (рис. 4.21), а в залозисто-ацинарному патерні ХЦР виявляється мембранно-цитоплазматична експресія муцинів *MUC1* і *MUC5AC* (рис. 4.22).

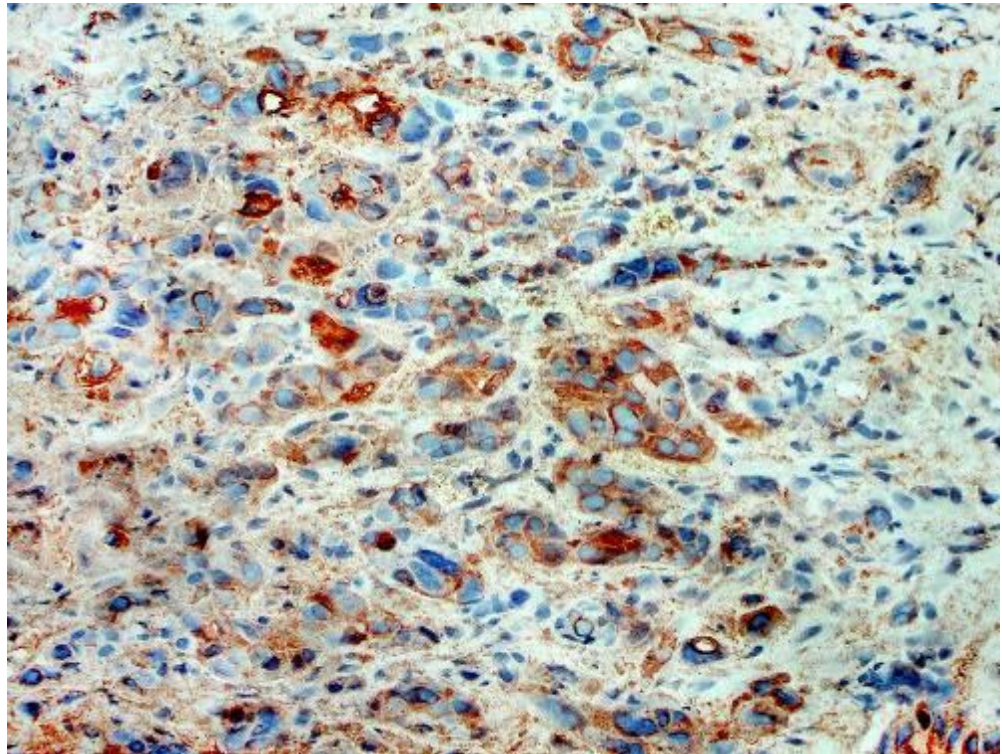


Рис.4.21 Цитоплазматична експресія СА 19-9 в пухлинних клітинах низькодиферційованого холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu CA 19-9, Clone C241:5:1:4*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. X 400.

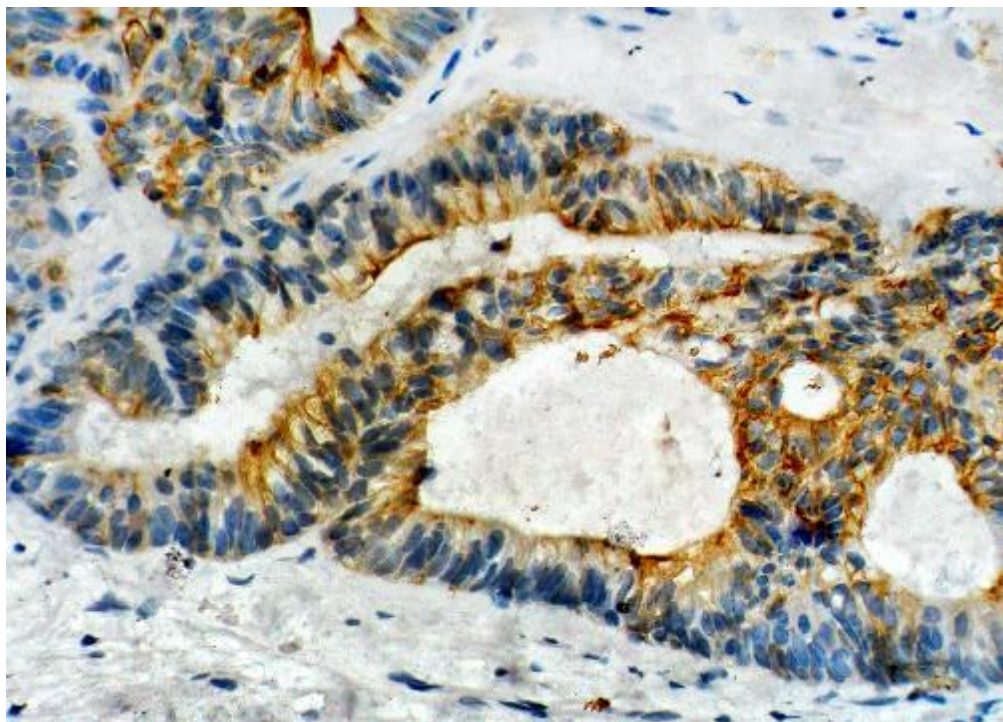


Рис.4.22 Мембранно-цитоплазматична експресія MUC1 в залозисто-ацинарному патерні холангіоцелюлярного раку. *Rb a-Hu MUC1, Clone S.854.6*. Система візуалізації DAKO EnVision + з діамінобензідіном. Зб. x 650.

Виконані ІГХ дослідження продемонстрували, що для холангіоцелюлярного раку характерним є імунотип HerPar 1 - | AFP +/- | CK7 + | CK8 +/- | CK19 + | CK20 +/- | CA125 + | CA19-9 + | CDX2 +/- | MUC1 + | MUC5AC +.

Проведені нами патоморфологічні дослідження показали, що метастази протокового раку підшлункової залози в печінці утворюють дуктулярні і залозисто-ацинарні мікроструктури в фібропластичній стромі, які з великою схожістю імітують первинний холангіоцелюлярний рак печінки. Це підтверджують патоморфологічні дослідження паралельних трепанобіоптатів первинного протокового раку підшлункової залози (рис. 4.23) і його метастазів в печінку, виконаних одночасно у одних і тих же хворих. Тубулярні і залозисто-ацинарні мікроструктури метастазу панкреатичного протокового раку мікроскопічно нічим не відрізняються від тубулярних і залозисто-ацинарних структур холангіоцелюлярного раку (рис. 4.24А.Б).

Для диференційної діагностики холангіоцелюлярного раку і метастазів у печінку протокового раку ПЖ ми застосували ІГХ маркування пухлинних клітин в панелі з визначенням експресії HerPar 1, AFP, CK7,8,19,20, а також CA19-9, CA125, CDX2 і муцинів: MUC1, MUC5AC. Результати проведеної нами в трепанобиопсіях печінки ІГХ діагностики ХЦР печінки і метастазів у печінку протокового раку ПЗ наведені в таблиці 4.3 (дивись вище). З даних, наведених у таблиці 4.3, видно, що для холангіоцелюлярного раку печінки і схожих по мікроструктурі метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози характерний однаковий спектр цитокератинів (CK7 +, CK19 +, CK8 +/-) і муцинів (MUC1 +, MUC5AC +), а також варіабельна експресія муциноподібного глікопротеїну CA125 і онкопротеїну CA19-9. Тому імуністохімічні дослідження не надають діагностично значущої інформації для диференційної діагностики холангіоцелюлярного раку печінки і метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози.

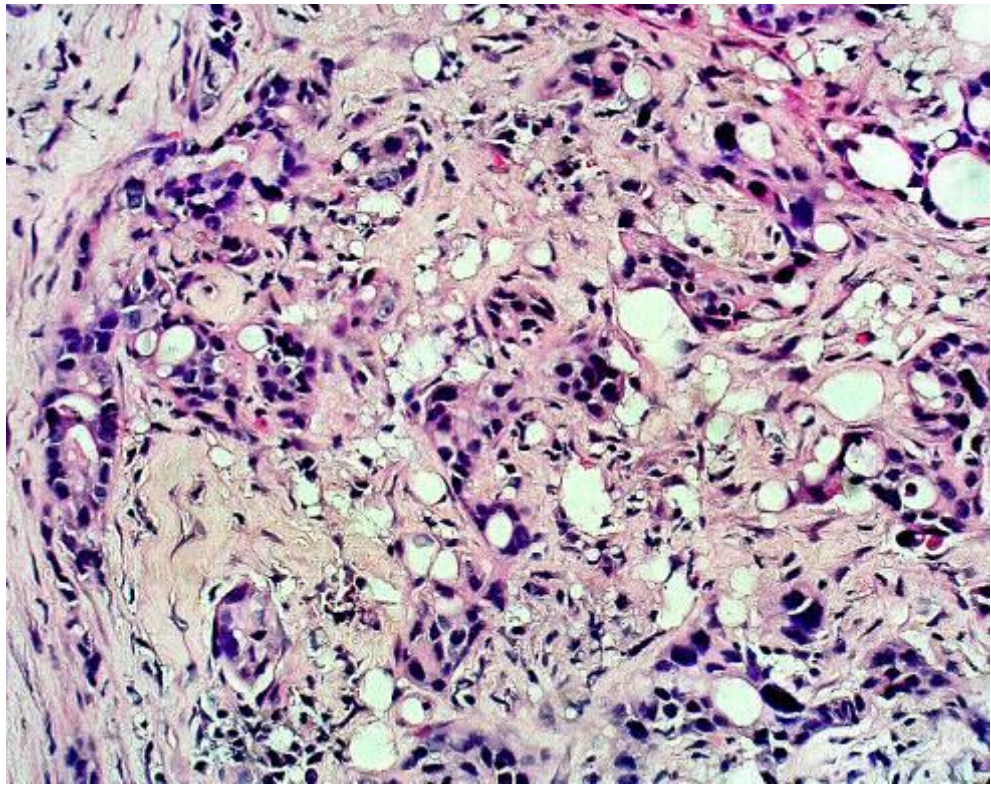


Рис. 4.23 Протоковий рак підшлункової залози. Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб. x 150.

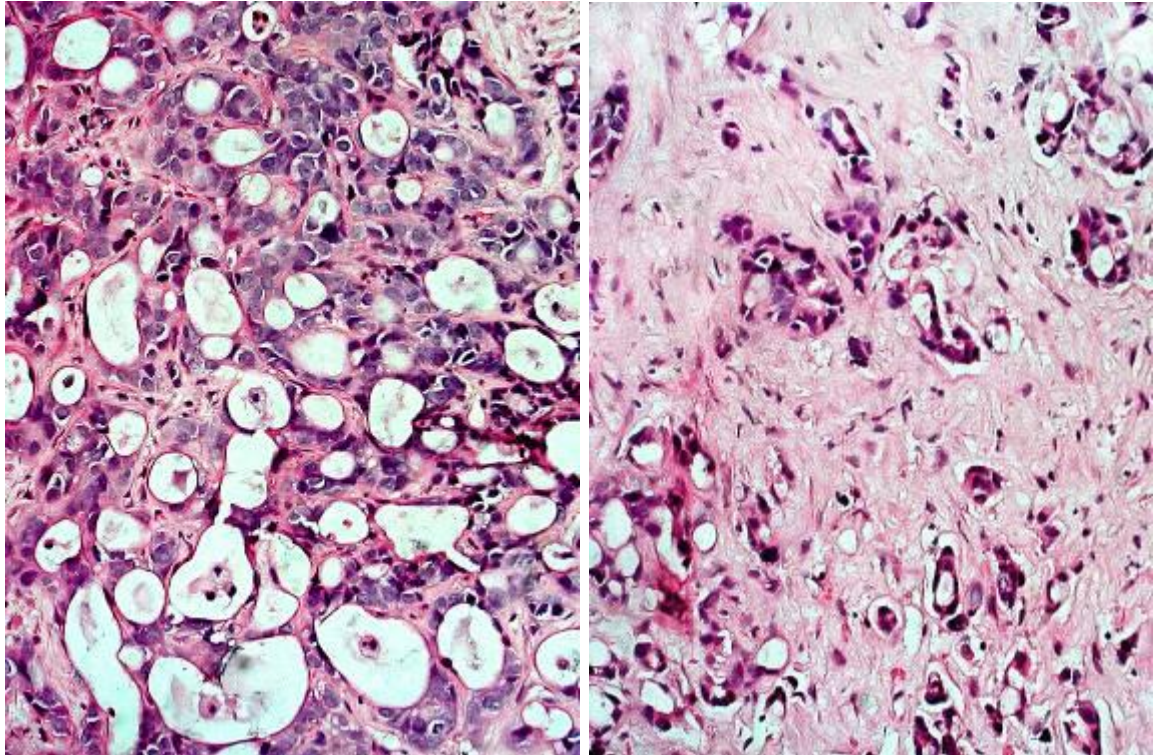


Рис. 4.24 А,Б. Метастаз протокового раку підшлункової залози (з рис.4.23) в печінці з наявністю задозисто-ацинарних (А) і тубулярних структур (Б) в фібропластичній стромі. Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: А і Б x 500.

Виконані патоморфологічні і ІГХ дослідження переконали, що в трепанобіоптатах печінки з обмеженою кількістю діагностичного матеріалу диференційна діагностика первинного холангіоцелюлярного раку печінки і метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози обов'язково вимагає додаткового інструментального та клініко-лабораторного дообстеження хворих. У 5 пацієнтів метастаз в печінку протокового раку ПЗ з вираженою десмопластичною строюю був верифікований при патоморфологічному дослідженні паралельного трепанобіоптату пухлини печінки та підшлункової залози, у 17 хворих з метастазами в печінку наявність первинного раку в підшлунковій залозі підтвердили наступні комп'ютерно-томографічні і прицільні ультразвукові дослідження.

За виконаними патоморфологічними дослідженнями також з'ясовано, що протоковий рак підшлункової залози в своїх метастазах в печінку імітує не тільки холангіоцелюлярний рак, а також імітує за мікроскопічною будовою метастази ацинарно-папілярних аденокарцином (рис.4.25) та слиз-продукуючих карцином (рис.4.26) шлунково-кишкового тракту. Ці результати свідчать про те, що за наявності в трепанобіоптаті печінки слиз-продукуючої карциноми, для виявлення первинної локалізації такої пухлини необхідні додаткові гастроскопічні та колоноскопичні обстеження хворих.

За результатами проведених нами патоморфологічних досліджень в трепанобіоптатах печінки тубулярну або залозисто-ацинарну структуру, крім метастазів протокового раку підшлункової залози, мали метастази аденокарциноми шлунка, колоректального раку, метастази нирковоклітинного раку і раку легені. Застосована нами імуногістохімічна панель для диференціальної діагностики ХЦР і метастатичних пухлин тубулярної і залозисто-ацинарної структури включала такі маркери, як HerPar-1, α -FTP, CK7, CK20, CDX2, CA 19-9, CA 125, MUC1, MUC2, MUC5AC, TTF -1.

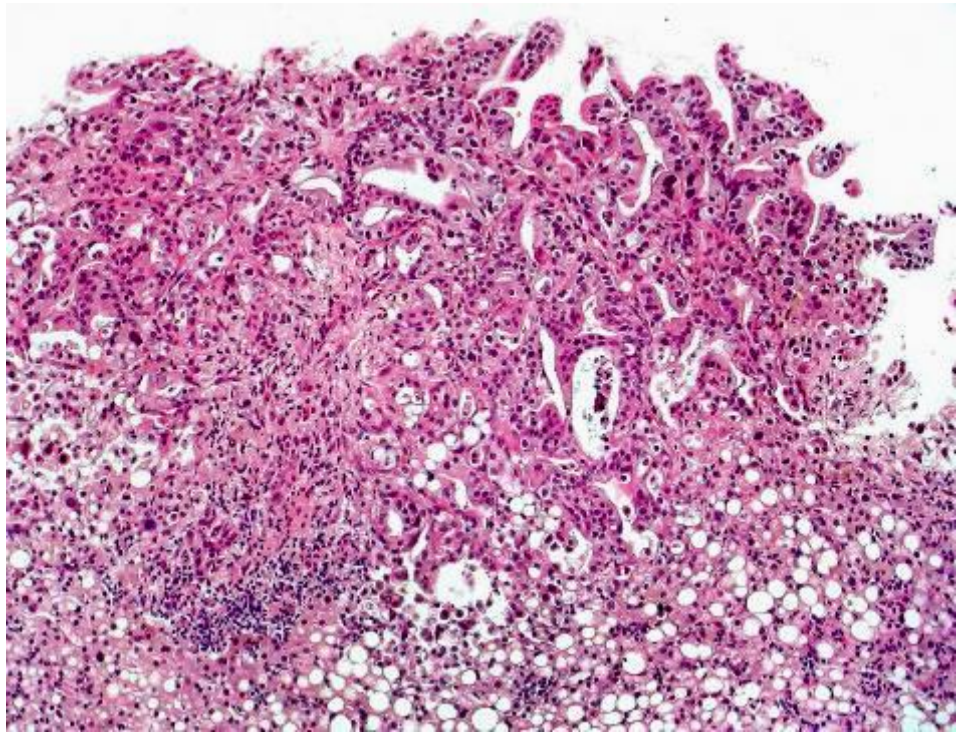


Рис. 4.25 Метастаз протокового раку підшлункової залози, що імітує в печінці ацинарно-папілярну аденокарциному шлунково-кишкового тракту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 250.

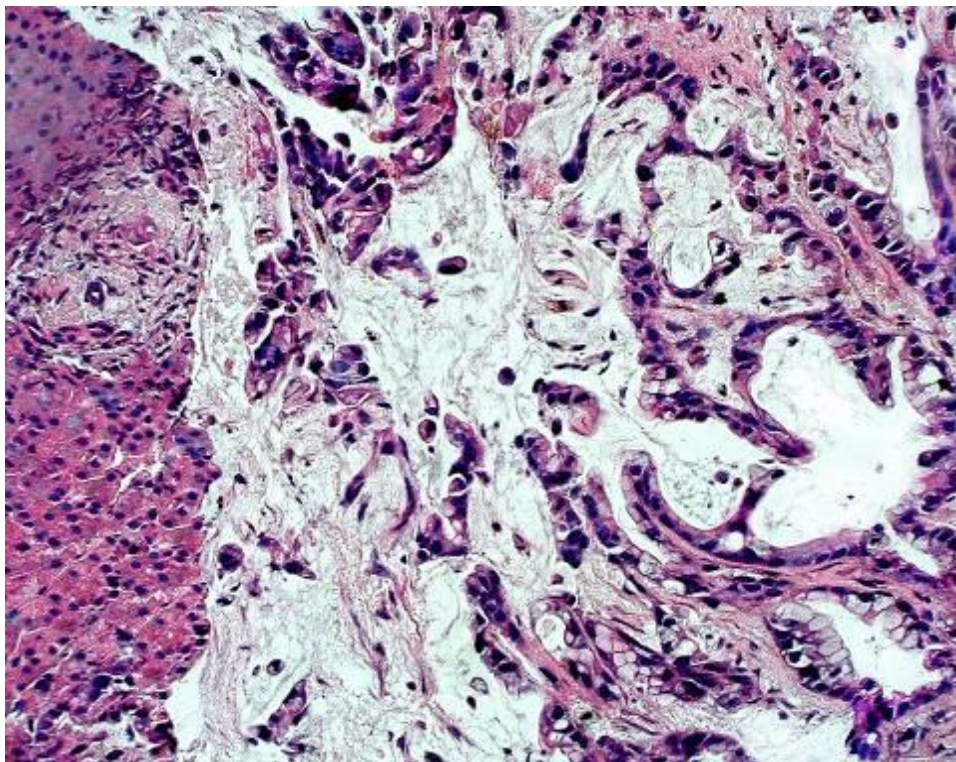


Рис. 4.26 Метастаз протокового раку підшлункової залози, що імітує в печінці слиз-продукуючий рак шлунково-кишкового тракту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 150.

Результати імуногістохімічного дослідження ХЦР і і метастазів у печінку пухлин тубулярної і залозисто-ацинарної структури наведені в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Імунофенотип холангіоцелюлярного раку печінки і метастазів у печінку пухлин тубулярної і залозисто-ацинарної структури

Тип пухлини	Експресія маркера										
	Нер Par-1	α-FTP	CK7	CK 20	CDX2	CA 19-9	CA 125	MUC 1	MUC 2	MUC 5AC	TTF-1
Холангіоцелюлярний рак печінки (n=15)	-	+/-	+	+/-	-	+	+	+	-	+	-
Метастаз протокового рака підшлункової залози (n=12)	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Метастаз аденокарциноми шлунка (n=10)	-	-	+	+	+	-	-/+	+	+	+	-
Метастаз колоректального раку (n=17)	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Метастаз нирковоклітинного рака (n=6)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Метастаз раку легенів (n=4)	-	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-	+

Результати проведеного нами імуногістохімічного аналізу метастазів у печінку аденокарциноми шлунка, яка в 10 спостереженнях була підтверджена при гастроскопії та УЗД, показали, що пухлинні клітини метастазів імунопозитивні по цитокератинам 7 і 20, в них виявляється експресія кишково-специфічного транскрипційного фактора CDX2, карбогідратного онкопротеїна CA19-9, муцину CA125 (MUC16), а також муцинів MUC1, MUC2, MUC5AC (табл. 4.4). В пухлинних клітинах метастазів аденокарциноми шлунка в печінці відсутня експресія TTF-1 і гепатоцитарних маркерів НерPar-1 і α-FTP.

Багато в чому подібний імуногістохімічний профіль також мали метастази в печінку колоректального раку: CK20 + / CDX2 + / CA19-9 + / CA125 + / MUC2 + / MUC5AC + (табл. 4.4). Пухлинні клітини цих метастазів були також імунонегативні по TTF-1 і по гепатоцитарним маркерам НерPar-

1, α -FTP (див. табл. 4.4). Одночасно з цим, пухлинні клітини метастазів у печінку колоректального раку відрізнялися відсутністю експресії цитокератину 7 і мембрано-асоційованого муцину MUC1 від метастазів у печінку аденокарциноми шлунка.

Таким чином, результати цих досліджень показали, що метастази в печінку аденокарциноми шлунка та колоректального раку тубулярної і залізисто-ацинарної структури мають подібний імуногістохімічний профіль експресії CK20, CDX2, CA 19-9 і муцинів CA 125, MUC2 і MUC5AC. Диференційне значення має відсутність експресії CK7 в метастазах колоректального раку і її наявність в метастазах аденокарциноми шлунка.

Виконані ІГХ дослідження показали, що в клітинах метастазів у печінку нирковоклітинного раку виявляється експресія CA 125 і не визначається експресія CK7 і CK20 (див. Табл. 4.4). Однак для підтвердження того, що це метастази первинного раку нирки необхідно використовувати дані комп'ютерній томографії, яка підтверджує наявність пухлини нирки.

За даними ІГХ аналізу нами визначено, що в клітинах метастазів раку легені в печінці виявляється ядерна експресія тиреоїдного транскрипційного фактора TTF-1, а також цитоплазматична експресія CK7, в пухлинних клітинах метастазів відсутня експресія CK20, CDX2 і CA125 (див. табл. 4.4).

Резюме.

В трепанобіоптатах печінки внутрішньопечінковий (периферійний) мас-формуєчий холангіоцелюлярний рак характеризується наявністю тубулярного, залозисто-ацинарного, солідно-клітинного і гніздно-клітинного мікроскопічних патернів, а також значною фібропластичною стромою. В тубулярному патерні холангіоцелюлярного раку розташовані, або гілкуваті дуктулярні структури з вузькими просвітами, або тубулярні структури з наявними просвітами, вистеленими кубоїдальними клітинами з еозинофільною цитоплазмою, округлими ядрами і майже непомітним ядерцем. В залозисто-ацинарному патерні холангіоцелюлярного раку

визначаються округлі залозистоподібні або розгалуджені ацинарні структури, вистелені багаторядним, двох-трьохрядним, або переважно однорядним стовбчастим, високопризматичним або циліндричним пухлинним епітелієм з овально-протяжними гіперхромними ядрами без помітних ядерцець. В деяких крупних ацинарних мікроструктурах визначаються кріброзні утворення та папілярні вирости з пухлинних клітин.

Солідно-клітинний патерн холангіоцелюлярного раку являє собою поширені ділянки тісно прилеглих одна до одної кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних клітин з гіперхромними ядрами, оточеними вузьким обідком цитоплазми, а гніздно-клітинний патерн утворюють скупчення кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних пухлинних клітин з гіперхромними ядрами без помітних ядерцець.

Встановлено, що у помірнодиференційованому G2 холангіоцелюлярному раку залозистоподібні і ацинарні структури вистелені переважно одно-двохрядним високопризматичним або циліндричним пухлинним епітелієм, вони зближені між собою і розділені вузькими сполучнотканинними прошарками, інвазія пухлинного епітелію в фібропластичну строму відсутня. У низькодиференційованому G3 холангіоцелюлярному раку залозистоподібні і ацинарні структури вистелені багаторядним поліморфним високопризматичним і циліндричним пухлинним епітелієм, який утворює пухлинні мікропапілярні і кріброзні структури; ацинарні і залозистоподібні структури зближені між собою, визначаються вогнища інвазії пухлинного епітелію через базальні мембрани в фібропластичну строму. Низькому ступеню диференціювання ХЦР притаманні солідно-клітинний і гніздно-клітинний патерни, до нього також відноситься скірозний варіант пухлини.

У низькодиференційованому ХЦР в трепанобіоптатах печінки поряд солідно-клітинними і гніздно-клітинними скупченнями в фібропластичній стромі спостерігаються рідкі, поодинокі дуктулоподібні структури, а в фібропластичній стромі можуть виявлятися поодинокі муцин-продукуючі

клітини або дрібні вогнища муциноподібного ослизнення строми. У низькодиференційованому ХЦР в пухлинних клітинах визначається різної інтенсивності цитоплазматична експресія СА 19-9, а в залозисто-ацинарному патерні ХЦР виявляється мембранно-цитоплазматична експресія муцинів MUC1 і MUC5AC.

В пухлинних клітинах холангіоцелюлярного раку у 97,22% хворих визначається цитоплазматична експресія СК7, імунопозитивні клітини складають $43,55 \pm 9,93\%$ СПГЗ злоякісної пухлини. У 45,29% хворих в клітинах холангіоцелюлярного раку визначається цитоплазматична експресія СК20, імунопозитивні клітини складають $50,28 \pm 16,35\%$ СПГЗ. У холангіоцелюлярному раку між рівнем експресії пухлинними клітинами СК7 і СК20 має місце негативна слабкої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = -0,1$).

В пухлинних клітинах холангіоцелюлярного раку печінки у 47,22% хворих визначається експресія α -фетопротейну, АФР-імунопозитивні клітини займають $17,25 \pm 9,67\%$ СПГЗ злоякісної пухлини. Експресія HerPac-1 у клітинах холангіоцелюлярного раку не виявляється. У холангіоцелюлярному раку між рівнем експресії пухлинними клітинами АФР і СК7 має місце пряма середньої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = +0,5$), між рівнем експресії АФР і СК20 спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +1$), а між між рівнем експресії СК7 і СК20 має місце негативна слабкої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = -0,1$).

У 72,97% пацієнтів в клітинах холангіоцелюлярного раку пухлини виявлена цитоплазматична і ядерна експресія HbcAg, у 43,25% пацієнтів в пухлинній тканині печінки визначена цитоплазматична експресія HbsAg. Експресія HbcAg і HbsAg виявлена в пухлинних холангіоцитах, в недиференційованих пухлинних клітинах і в одиничних фібробластоподібних клітинах. Значний рівень експресії HbcAg в холангіоцелюлярному раку має місце у 40,22% хворих, помірний рівень - у 12,75% пацієнтів, слабкий рівень експресії - у 20% хворих. Значний рівень

експресії HBsAg клітинами холангіоцелюлярного раку визначається у 27,73% хворих, помірний - у 10,37% пацієнтів, слабкий рівень експресії - у 5,15% хворих. Між рівнем експресії клітинами холангіоцелюлярного раку HBsAg і HBsAg спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +0,82$).

Характерним для холангіоцелюлярного раку печінки є імунофенотип CK7 + | CK8 +/- | CK19 + | CK20 +/- | CA125 + | CA19-9 + | CDX2 +/- | MUC1 + | MUC5AC + | AFP +/- | HerPar 1 -, який певною мірою відрізняє його від гепатоцелюлярного раку печінки, а також від метастазів в печінку тубулярної та залозисто-ацинарної мікроструктури раку інших органів.

Для холангіоцелюлярного раку печінки і схожих за тубулярною та залозисто-ацинарною мікроструктурою метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози характерний однаковий спектр цитокератинів (CK7 +, CK19 +, CK8 +/-) і муцинів (MUC1 +, MUC5AC +), а також варіабельна експресія муциноподібного глікопротеїну CA125 і онкопротеїну CA19-9. Тому для диференційної діагностики холангіоцелюлярного раку печінки і метастазів у печінку протокового раку підшлункової залози необхідне або додаткове комп'ютерно-томографічне і прицільне ультразвукове дослідження підшлункової залози або патоморфологічне дослідження паралельного трепанобіоптату пухлини печінки та підшлункової залози. Протоковий рак підшлункової залози в своїх метастазах в печінку імітує не тільки холангіоцелюлярний рак, а також імітує метастази ацинарно-папілярних аденокарцином та слиз-продукуючих карцином шлунково-кишкового тракту. Тому за наявності в трепанобіоптаті печінки слиз-продукуючої карциноми, для виявлення її первинної локалізації необхідні додаткові гастроскопічні та колоноскопичні обстеження хворих.

Метастази в печінку аденокарциноми шлунка та колоректального раку тубулярної та залозисто-ацинарної структури мають подібний ІГХ профіль позитивної експресії CK20, CDX2, CA 19-9 і муцинів CA 125, MUC2 і MUC5AC, диференційне значення має відсутність експресії CK7 у

метастазах колоректального раку і її наявність в метастазах аденокарциноми шлунка. Для диференційної діагностики у трепанобіоптатах печінки подібних за ІГХ профілем метастазів протокового раку підшлункової залози, аденокарциноми шлунка та колоректального раку необхідні додаткові дані клініко-інструментальних досліджень пацієнтів (УЗД, комп'ютерної томографії, гастроскопії й колоноскопії).

Матеріалу розділу відображені у роботах: [16, 37-39, 260].

РОЗДІЛ 5

ПРОГНОСТИЧНІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОГО ТА ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНОГО РАКУ ПЕЧІНКИ

Проліферативна активність і апоптоз пухлинних клітин, які визначаються при мікроскопії за наявністю фігур мітозу або апоптозу, а також ІГХ методами, певною мірою свідчать про темпи росту пухлини і її прогресування, тобто можуть бути прогностичними ознаками темпу росту пухлини. В той же час, рівні експресії матриксних металопротеїназ і їх інгібіторів в пухлині, а також рівні експресії пухлинними клітинами молекул міжклітинної адгезії можуть прогнозувати інвазивні і метастатичні властивості пухлин.

5.1 Мікроскопічна і імуногістохімічна характеристика проліферативно-апоптотичних процесів в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку печінки

Мікроскопічний аналіз продемонстрував нерівномірність розподілу клітин в мітозі або в апоптозі в різних ділянках пухлини, а також значну варіабельність проліферативної і апоптотичної активності пухлинних клітин ГЦР і ХЦР у кожного хворого. При цьому з'ясувалась важлива деталь: фігури мітозу при мікроскопії дуже гарно виявляються в клітинах ГЦР і майже не розрізняються в гіперхромних ядрах ХЦР з щільним хроматином. В стандартизованому полі зору мікроскопа в ГЦР виявлялось максимально 6-8 клітин з фігурами мітозу в поліморфних ядрах (рис. 5.1) і до 10 апоптотичнозмінених клітин (рис. 5.2). Це явно контрастувало з ХЦР, в якому максимально виявлялось по 1-2 пухлинні клітини в стані мітозу або апоптозу.

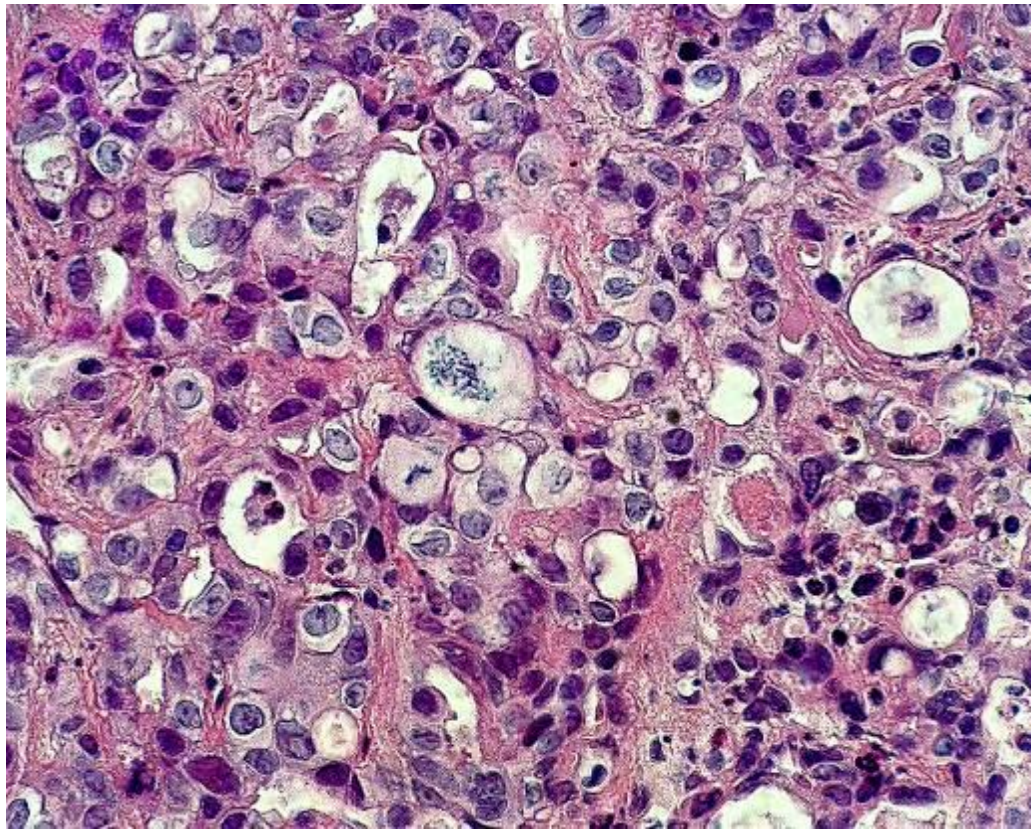


Рис. 5.1 Значна кількість фігур мітозу в поліморфних ядрах клітин гепатоцелюлярного раку. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 800.

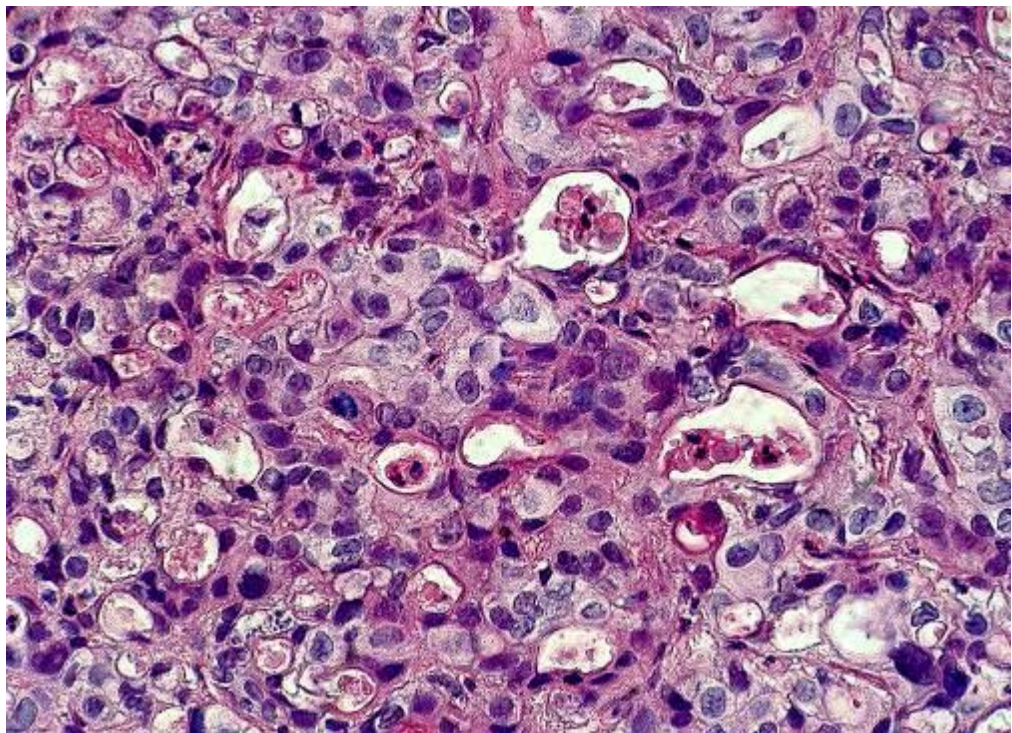


Рис. 5.2 Значна кількість пухлинних клітин гепатоцелюлярного раку в стані апоптозу. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 800.

Враховуючи виявлені обставини, за основу аналізу проліферативно-апоптотичної активності клітин гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку було покладено ІГХ визначення експресії ядерного маркера проліферації клітин Ki67, онкогенного білка p53 і фермента апоптотичної деградації каспази-3.

При ІГХ аналізі рівня проліферації клітинами гепатоцелюлярного раку за ядерною експресією Ki67 були підтверджені мікроскопічні дані про неоднозначні рівні проліферативної активності пухлинних клітин, які певною мірою залежали від рівня диференціювання пухлини і значно варіювали у окремих хворих. Більш ніж у половини пацієнтів (у 63,64% хворих) рівень експресії цього маркера був помірним (2-3 бала), високий рівень ядерної експресії Ki67 клітинами гепатоцелюлярного раку в 4 бали (рис. 5.3) був виявлений у 25,45% пацієнтів і у 10,91% хворих рівень експресії Ki67 в ГЦР був низьким (1 бал). Середній рівень ядерної експресії Ki67 клітинами гепатоцелюлярного раку склав $2,72 \pm 0,96$ бала. За даними фотоцифрової морфометрії площа, займана Ki-67-імунопозитивними клітинами, становила $57,18 \pm 15,92\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку (табл.5.1).

За результатами проведених нами імуногістохімічних досліджень в гепатоцелюлярному раку переважав слабкий рівень цитоплазматичної експресії ферменту апоптотичної деградації каспази-3 пухлинними клітинами, який був визначений у 47,28% хворих. Високий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 (Рис.5.4) клітинами гепатоцелюлярного раку виявлений у 27,27% пацієнтів, а помірний рівень експресії каспази-3 пухлинними клітинами був виявлений у 25,45% хворих. При фотоцифровій морфометрії встановлено, що каспаза-3- імунопозитивні клітини з різним рівнем експресії цього ферменту в середньому займали $49,22 \pm 19,76\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку (табл. 5.1).

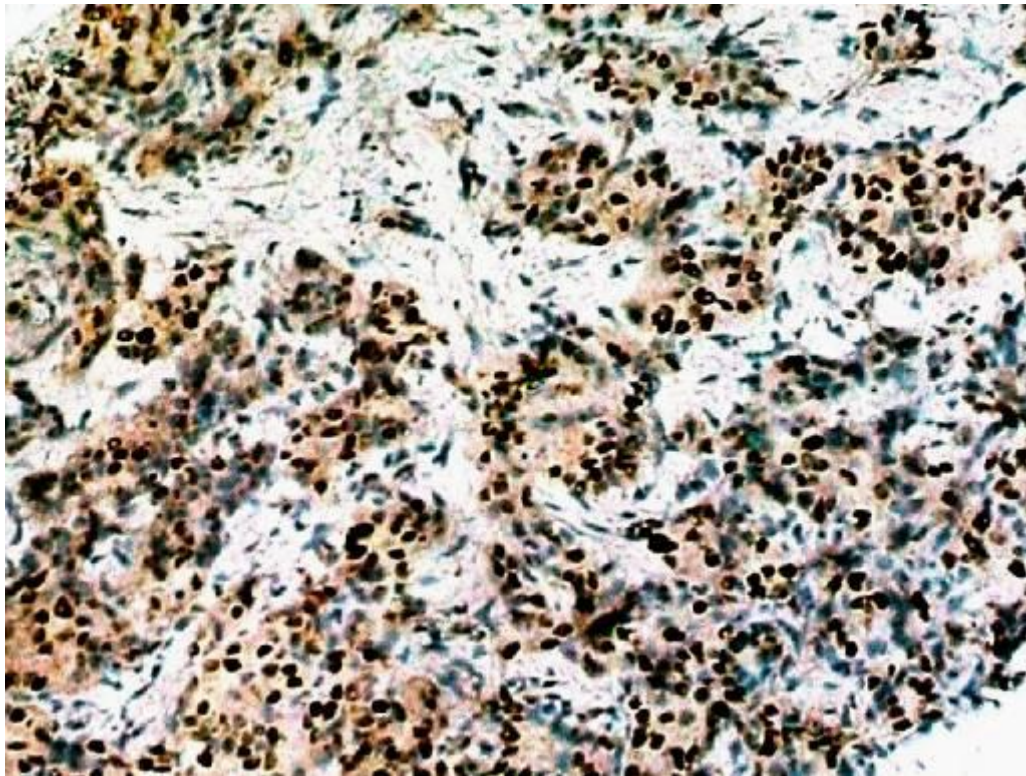


Рис. 5.3 Високий рівень ядерної експресії Ki-67 клітинами гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 400.

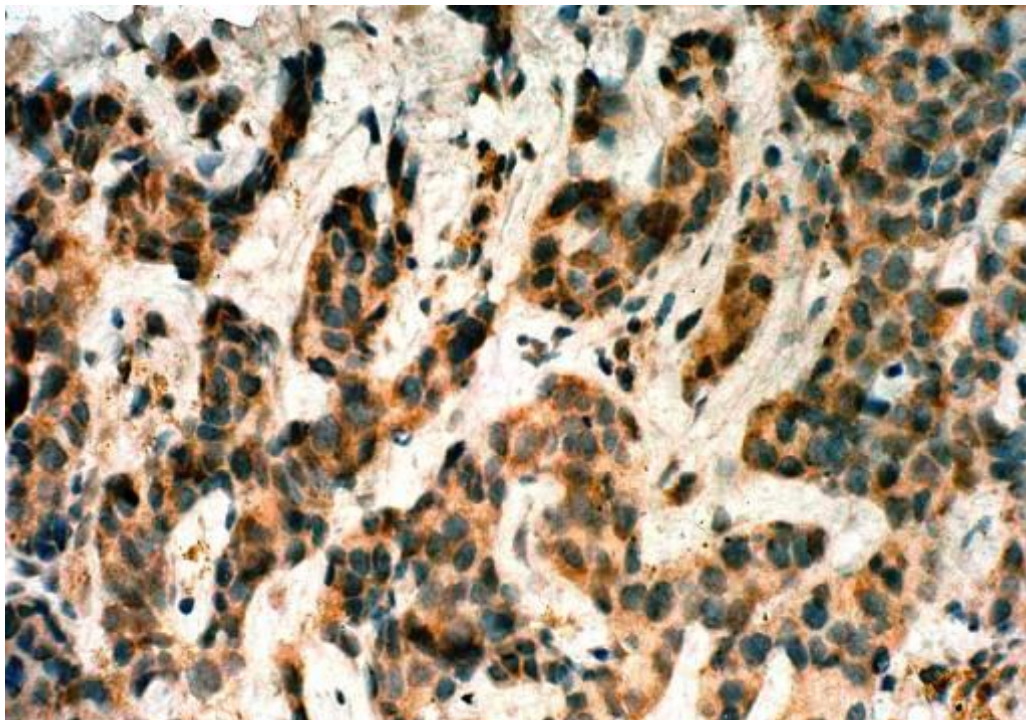


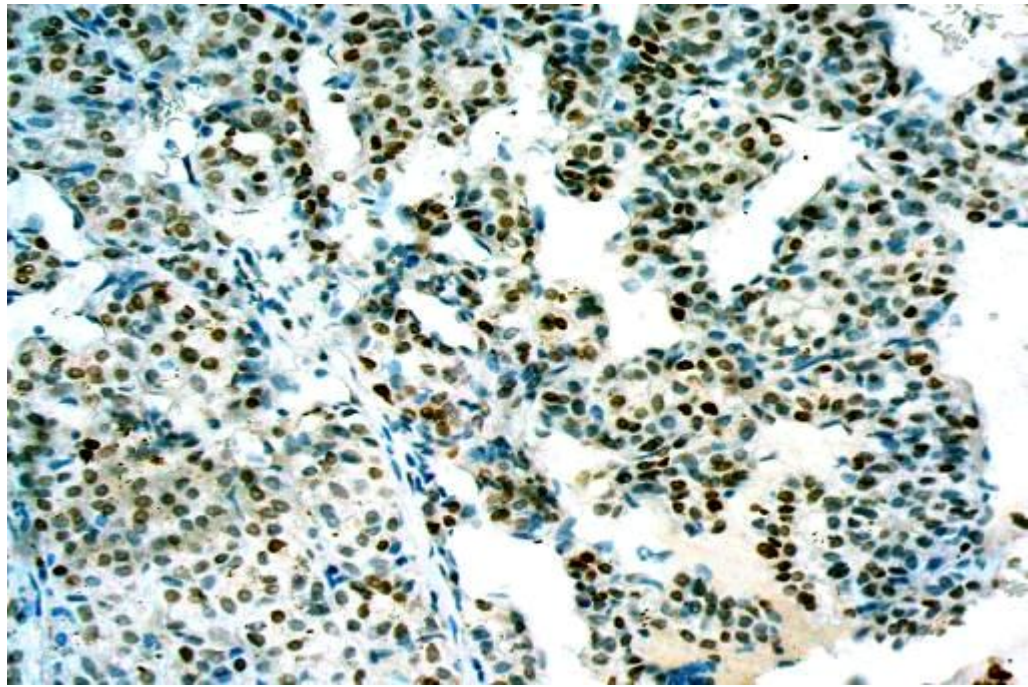
Рис. 5.4 Високий рівень експресії каспази-3 в цитоплазмі клітин гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP03*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

Проведені імуногістохімічні дослідження трепанобіоптатів печінки показали, що в клітинах гепатоцелюлярного раку переважала гіперекспресія ядерного білка p53 (рис. 5.5). Гіперекспресія p53 (рис. 5.5) клітинами гепатоцелюлярного раку (тобто наявність $\geq 30\%$ імунопозитивних клітин) була виявлена у 61,82% хворих; у 21,82% пацієнтів визначався високий рівень експресії цього ядерного білка, при якому в пухлині визначалося 11-29% p53-імунопозитивних клітин; у 16,36% хворих рівень експресії p53 був низьким, у пухлині виявлялося менше 10% клітин з імунопозитивними ядрами, за даними фотоцифрової морфометрії середня площа p53-імунопозитивних клітин становила $53,12 \pm 33,29\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку (таблиця 5.1). У той же час, у пацієнтів, у яких визначалася гіперекспресія p53, рівень експресії каспази-3 був слабким або помірним.

Таблиця 5.1

Характеристика експресії Ki-67, каспази-3 і p53 клітинами гепатоцелюлярного раку печінки

Основні параметри оцінки експресії маркерів в пухлині	Гепатоцелюлярна карцинома		
	Ki-67	каспаза-3	p53
Площа імунопозитивних клітин у пухлині	57,18±15,92%	49,22±19,76%	53,12±33,29%
Відсоток хворих з гіперекспресією p53			61,82%
Відсоток хворих з високим рівнем експресії маркера	25,45%	27,27%	21,82%
Відсоток хворих з помірним рівнем експресії маркера	63,64%	25,45%	
Відсоток хворих з низьким рівнем експресії маркера	10,91 %	47,28%	16,36%



5.5 Гіперекспресія p53 клітинами гепатоцелюлярного раку. *Mo a-Hu p53 Protein, Clone DO-7*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 36. x 400.

В результаті проведених нами ІГХ досліджень холангіоцелюлярного раку з'ясувалася велика індивідуальна варіабельність рівня проліферації пухлинних клітин у обстежених хворих. У 51,28% хворих рівень експресії Ki-67 клітинами ХЦР був помірним (становив 2-3 бали), у 23,16% пацієнтів він був високим (становив 4 бали), у 25,56% хворих рівень експресії Ki-67 був низьким (1 бал) (рис.5.6). Встановлено, що середній рівень ядерної експресії Ki-67 клітинами ХЦР у обстежених хворих склав $2,46 \pm 1,09$ бала. При фотоцифровій морфометрії визначено, що Ki-67 імунопозитивні клітини займали $54,21 \pm 22,18\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку.

У 48,72% хворих на холангіоцелюлярний рак рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 пухлинними клітинами був низьким, при якому в пухлині виявлялося $17,22 \pm 5,33\%$ імунопозитивних клітин, у 23,08% пацієнтів в пухлині виявлено помірний рівень ядерно-цитоплазматичної експресії каспази-3 (рис.5.7) з наявністю $47,22 \pm 10,57\%$ імунопозитивних клітин. Високий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3, при якому в пухлині

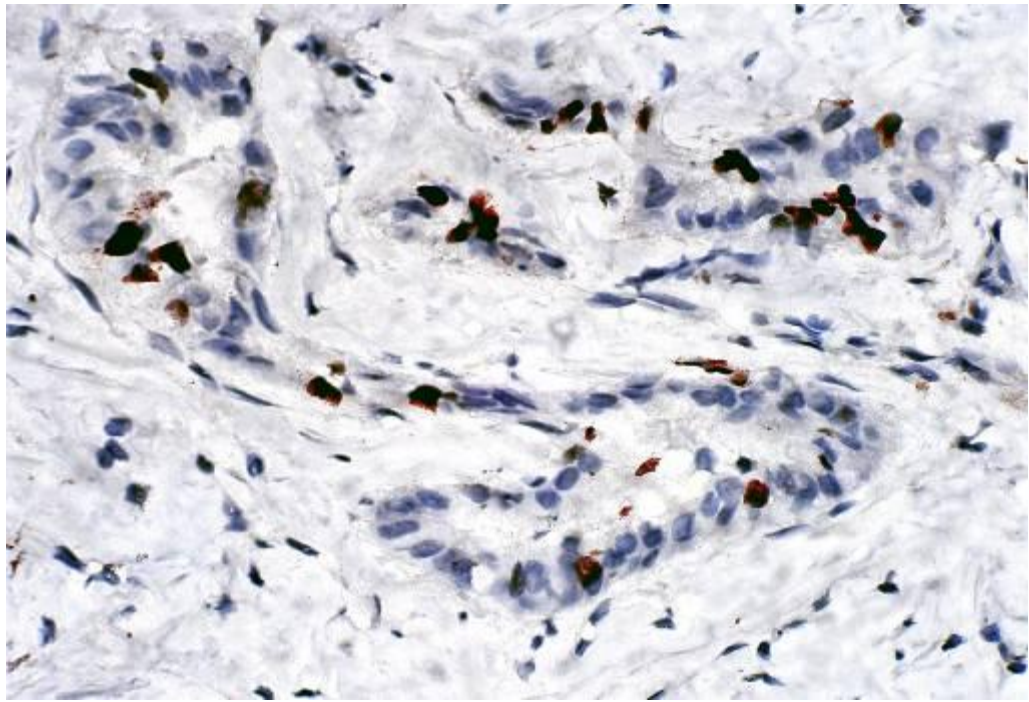


Рис. 5.6 Низький рівень ядерної експресії Ki-67 клітинами холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 600.

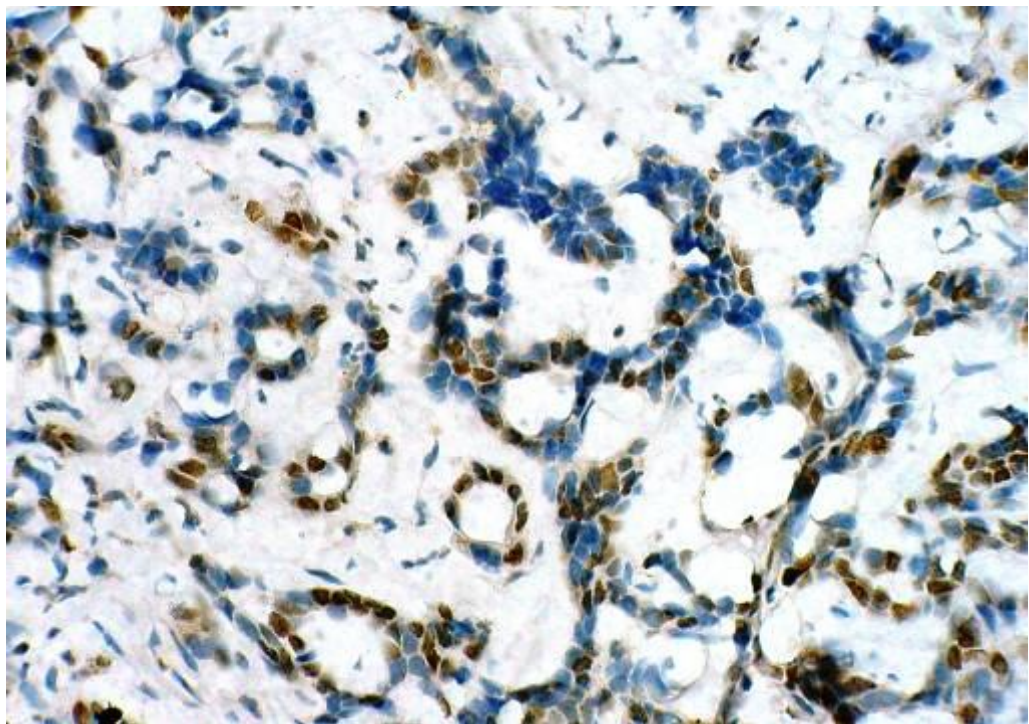


Рис. 5.7 Помірний рівень ядерно-цитоплазматичної експресії каспази-3 в клітинах холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP03*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 400.

виявлено $85,55 \pm 12,12\%$ імунопозитивних клітин, визначався в $28,2\%$ спостережень холангіоцелюлярного раку (табл.5.2). За даними фотоцифрової морфометрії каспаза-3-імунопозитивні пухлинні клітини займали $45,74 \pm 20,15\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки.

Проведені імуногістохімічні дослідження протеїну p53, що є продуктом онкосупресорного гена p-53, показали, що у $41,03\%$ хворих холангіоцелюлярним раком печінки в пухлині визначалося $\geq 30\%$ p53-імунопозитивних клітин, що свідчило про гіперекспресію ядерного білка p53 в злоякісних клітинах (рис.5.8). Високий рівень ядерної експресії p53, при якому в ХЦР спостерігалось від 10 до 29% p53-імунопозитивних клітин, визначався у $20,51\%$ пацієнтів. У $33,33\%$ хворих ХЦР рівень експресії p53 був низьким, у пухлині виявлялося менше 10% клітин з імунопозитивними ядрами (табл.5.2), у $5,13\%$ хворих експресія p53 в ядрах пухлинних клітин відсутня. Це підтверджує положення, яке склалося в онкопатології, про те, що високий рівень експресії білка p53 в ядрах злоякісних клітин, обумовлений мутацією і інактивацією гена p-53, тому висока ядерна експресія білка p53 сполучена зі зниженням рівня апоптозу пухлинних клітин. Дані фотоцифрової морфометрії показали, що p53-імунопозитивні пухлинні клітини, в середньому, становили $50,45 \pm 28,15\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки.

Експресії протеїну p53 в ядрах клітин перифокальної непухлинної тканини (тобто в ядрах холангіоцитів і гепатоцитів печінки) нами не виявлено. Це пояснюється тим, що в нормі ген p-53 реагує на появу мутантної ДНК в клітині, що ділиться, зупинкою клітинного циклу і стимуляцією апоптозу, а білок p53, що кодується їм, має короткий період напіврозпаду і тому імуногістохімічними методами не виявляється в здоровій тканині.

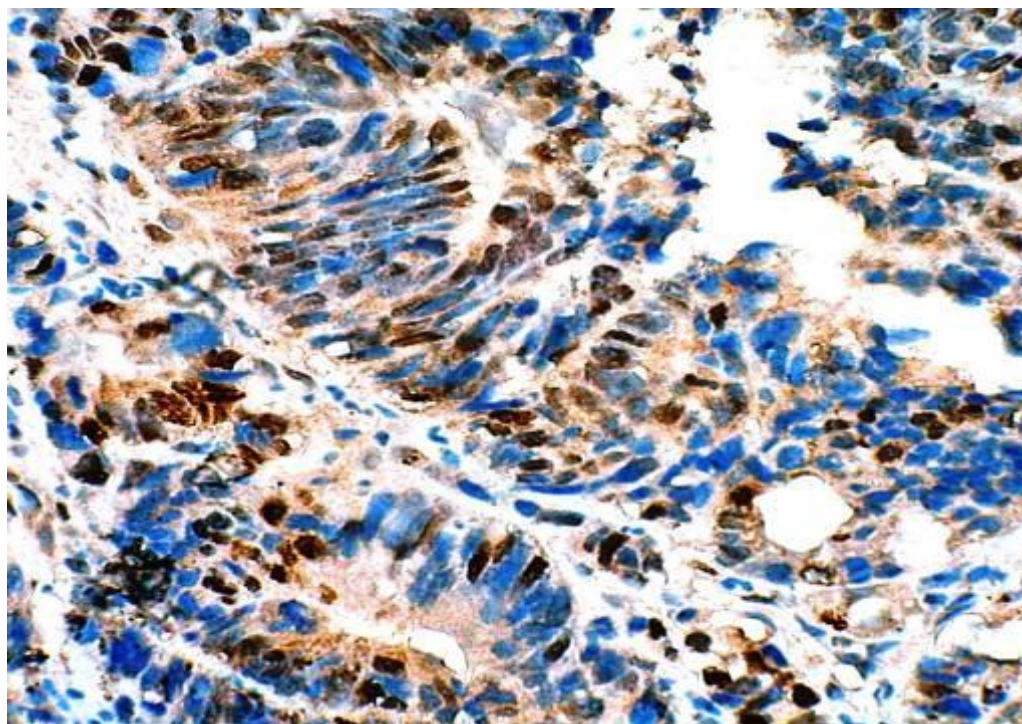


Рис. 5.8 Гіперекспресія p53 клітинами холангіоцелюлярного раку. *Mo a-Hu p53 Protein, Clone DO-7*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 36. x 650.

Таблиця 5.2

Характеристика експресії p53, каспази-3 і Ki-67 клітинами холангіоцелюлярного раку печінки

Основні параметри оцінки експресії маркерів в пухлині	Холангіоцелюлярний рак		
	Ki-67	каспаза-3	p53
Площа імунопозитивних клітин у пухлині	54,21±22,18%	45,74±20,15%	50,45±28,15 %
Відсоток хворих з гіперекспресією p53			41,03%
Відсоток хворих з високим рівнем експресії маркера	23,08%	28,2%	20,51%
Відсоток хворих з помірним рівнем експресії маркера	51,28%	23,08%	
Відсоток хворих з низьким рівнем експресії маркера	25,64%	48,72%	33,33%

5.2 Імуногістохімічна характеристика експресії MMP-9, TIMP-1, β -катеніну та E-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки

Проведені ІГХ дослідження рівня експресії матриксної металопротеїнази-9 (MMP-9) показали, що у 92,73% хворих в злоякісних клітинах гепатоцелюлярного раку печінки визначається цитоплазматична експресія MMP-9. Майже у половини обстежених пацієнтів переважав помірний рівень експресії MMP-9 в гепатоцелюлярному раку (рис.5.9), який складав $72,28 \pm 20,3$ УООЩ і був виявлений у 49,09% хворих; у 25,46% пацієнтів рівень експресії MMP-9 пухлинними клітинами був низьким і становив $37,21 \pm 7,25$ УООЩ, а у 18,18% хворих визначався високий рівень експресії MMP-9 клітинами гепатоцелюлярного раку (рис.5.10), що становив $167,71 \pm 46,61$ УООЩ. У 7,27% хворих експресія MMP-9 в клітинах гепатоцелюлярного раку була вкрай низькою (становила $8 \pm 2,12$ УООЩ) і розцінена як негативна експресія.

При фотоцифровій морфометрії встановлено, що площа, займана MMP-9-імунопозитивними клітинами, становила в середньому $59,33 \pm 22,57\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку печінки. При низькому рівні експресії одиночні MMP-9-позитивні пухлинні клітини або їх групи виявлялися як у центрі пухлини, так і на її периферії.

Крім цього, у 36,36% хворих було виявлено низький або помірний рівень цитоплазматичної експресії MMP-9 в гепатоцитах перитуморозної зони печінки.

При ІГХ дослідженні тканинного інгібітору матриксних металопротеїназ-1 (TIMP-1) було встановлено, що експресія цього тканинного інгібітору виявляється у 80% хворих в цитоплазмі клітин гепатоцелюлярного раку.

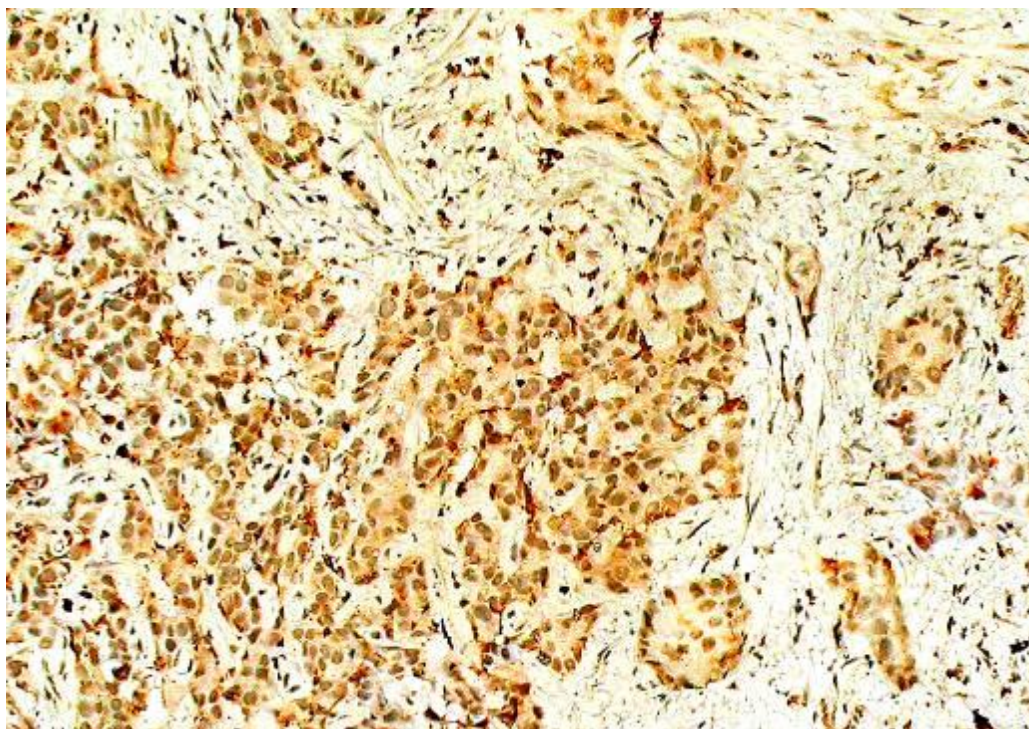


Рис. 5.9 Помірний рівень експресії MMP-9 клітинами гепатоцелюлярного раку. *Rb a-Hu MMP-9*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 150



Рис. 5.3 Високий рівень експресії MMP-9 клітинами гепатоцелюлярного раку. *Rb a-Hu MMP-9*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. X400

Переважав низький рівень цитоплазматичної експресії TIMP-1, який складав $28,35 \pm 5,89$ УООЩ і був виявлений у 47,27% хворих на гепатоцелюлярний рак (рис.5.11). Високий рівень експресії TIMP-1 пухлинними клітинами ($170,5 \pm 41,43$ УООЩ) був встановлений у 18,18% пацієнтів з гепатоцелюлярним раком, помірний рівень експресії цього ферменту злякисними клітинами ($85 \pm 16,69$ УООЩ) виявлявся у 14,55% хворих на гепатоцелюлярний рак печінки (рис.5.12).

За даними фотоцифрової морфометрії TIMP-1-імунопозитивні клітини виявлялися в різних ділянках пухлини і займали $21,94 \pm 6,27\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку печінки, тобто більш ніж вдвічі меншу площу, ніж MMP-9-позитивні клітини в цій пухлині (табл.5.3).

Як видно з наведеної таблиці 5.3 порівняльний аналіз рівнів експресії MMP-9 і TIMP-1 показав, що в гепатоцелюлярному раку MMP-9-імунопозитивні клітини займали більше половини площі зрізу пухлини, високий і середній рівень експресії MMP-9 в ГЦР спостерігався більш ніж у 60% хворих (табл. 5.3), в той час як високий і середній рівень експресії TIMP-1 в гепатоцелюлярному раку спостерігався тільки у 32,7% хворих.

Слід зазначити, що високий або помірний рівень експресії MMP-9 клітинами гепатоцелюлярного раку печінки спостерігався в пухлинах у тих хворих, у яких одночасно в гепатоцелюлярному раку виявлявся низький рівень експресії TIMP-1 пухлинними клітинами.

Проведений нами кореляційний аналіз показав, що у хворих на гепатоцелюлярний рак печінки між високим рівнем експресії MMP-9 і низьким рівнем експресії TIMP-1 пухлинними клітинами спостерігається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = -0,67$).

З урахуванням літературних даних, отримані нами дані свідчать про високий потенціал інвазивності та агресивності гепатоцелюлярного раку печінки.

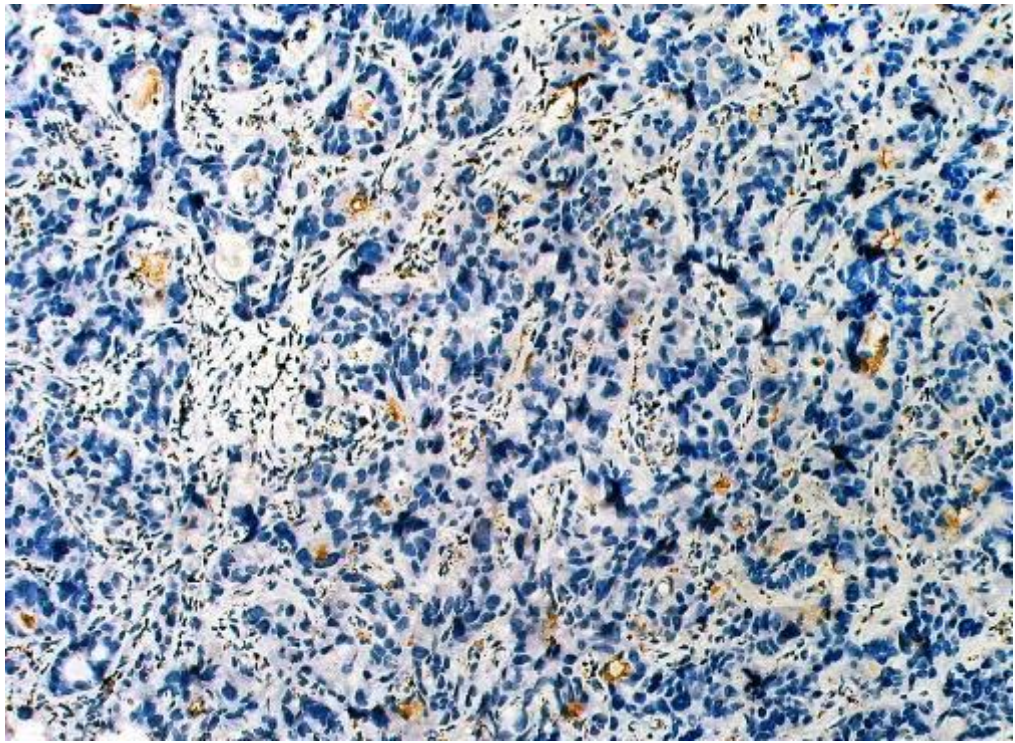


Рис. 5.11 Низький рівень експресії TIMP-1 в гепатоцелюлярному раку печінки. Мо *a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

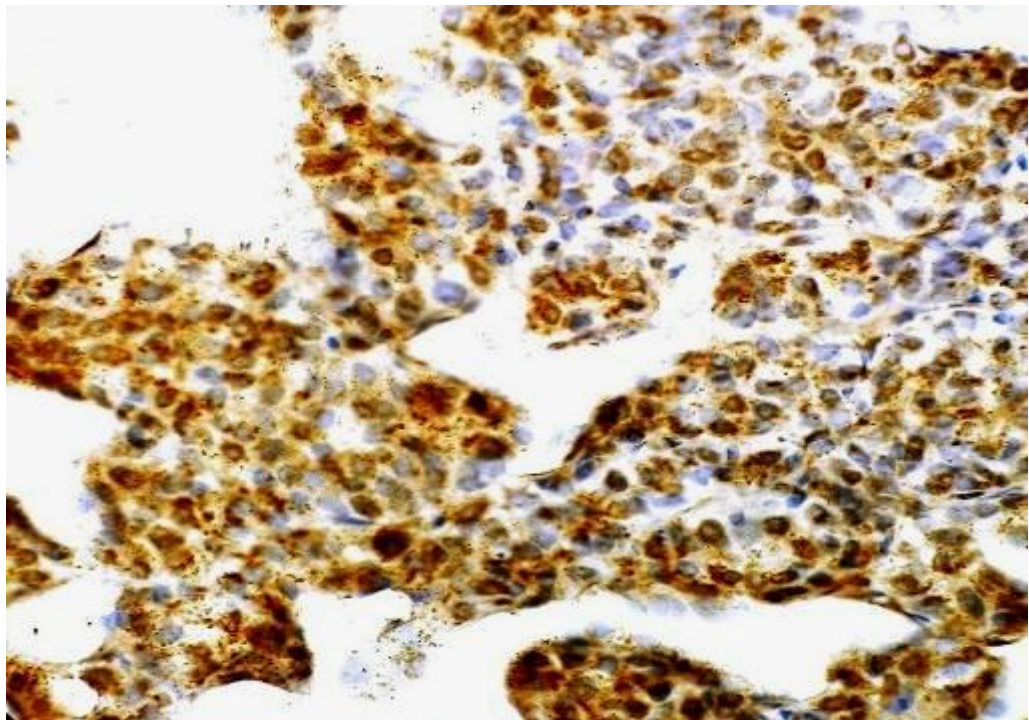


Рис. 5.12 Високий рівень експресії TIMP-1 клітинами гепатоцелюлярного раку. Мо *a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 650.

Параметри експресії MMP-9 і TIMP-1 в гепатоцелюлярному раку печінки

Основні параметри експресії ферментів в пухлині	MMP-9	TIMP-1
Відсоток хворих з експресією ферментів в пухлині	92,73%	80%
Площа імунопозитивних клітин у пухлині	59,33±22,57%	21,94±6,27%
Відсоток хворих з високим рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	18,18%	18,18%
Відсоток хворих з помірним рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	49,09%	14,55%
Відсоток хворих з низьким рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	25,46 %	47,27%

При ІГХ аналізі експресії матриксної металопротеїнази-9 (MMP-9) в холангіоцелюлярному раку печінки з'ясувалося, що цитоплазматична експресія цього ферменту визначалася в цитоплазмі пухлинних клітин у 89,74% хворих. Високий (рис.5.13) і помірний рівень експресії MMP-9 (134,04±21,47 УООЩ і 74,83±14,64 УООЩ, відповідно) пухлинними клітинами був виявлений у однакового відсотка хворих (по 30,77%), в той час як низький рівень експресії MMP-9 (32,88±9,6 УООЩ) визначався у 28,2% пацієнтів. У 10,26% випадків визначався вкрай низький рівень експресії MMP-9, що становив $9,16 \pm 3,7$ УООЩ і був розцінений як негативний. За даними фотоцифрової морфометрії MMP-9-імунопозитивні пухлинні клітини становили в середньому 52,71±20,86% СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки (табл. 5.6). При цьому у 5,12% хворих на ХЦР печінки виявлялася слабка позитивна експресія MMP-9 в цитоплазмі гепатоцитів, розташованих поблизу пухлини.

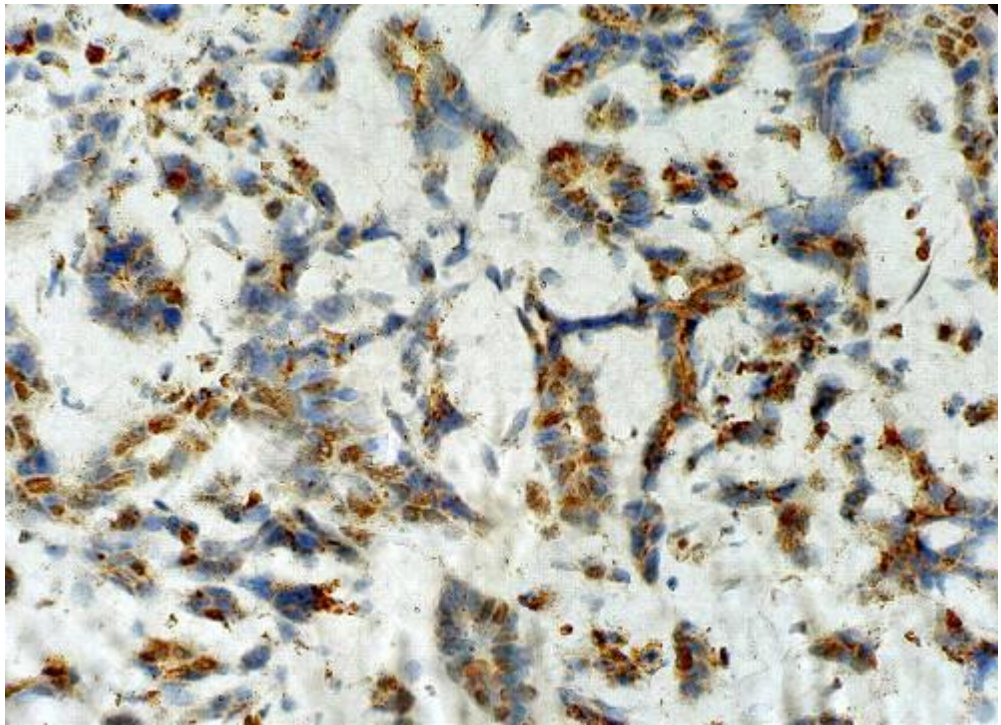


Рис. 5.13 Високий рівень експресії MMP-9 клітинами холангіоцелюлярного раку. *Rb a-Hu MMP-9*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 36. x 400.

Таблиця № 5.4

Параметри експресії MMP-9 і TIMP-1 в холангіоцелюлярному раку печінки

Основні параметри експресії ферментів в пухлині	MMP-9	TIMP-1
Відсоток хворих з експресією ферментів в пухлині	89,74%	74,36%
Площа імунопозитивних клітин у пухлині	52,71±20,86%	33,05±13,85%
Відсоток хворих з високим рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	30,77%	17,95%
Відсоток хворих з помірним рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	30,77%	20,51%
Відсоток хворих з низьким рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	28,2%	35,9%

За результатами ІГХ досліджень позитивна експресія ТІМР-1 виявлялася в клітинах холангіоцелюлярного раку у 74,36% хворих. Переважав низький рівень експресії ТІМР-1 злюкисними клітинами, який складав $34,77 \pm 7,63$ УООЩ і був виявлений у 35,9% хворих. Високий рівень експресії ТІМР-1 ($137,42 \pm 12,66$ УООЩ) в холангіоцелюлярному раку визначався у 17,95% хворих, помірний рівень експресії ТІМР-1 ($75,75 \pm 11,68$ УООЩ) пухлинними клітинами - у 20,51% пацієнтів. Площа ТІМР-1 імунопозитивних клітин складала $33,05 \pm 13,85\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки (див. табл. 5.4). Експресії ТІМР-1 в клітинах прилеглої непухлинної тканини печінки у хворих на холангіоцелюлярний рак нами не виявлено.

Було встановлено, що високий або помірний рівень експресії ММР-9 клітинами холангіоцелюлярного раку печінки спостерігався у хворих з низьким рівнем експресії ТІМР-1 в цих же пухлинах.

Проведений нами кореляційний аналіз показав, що у хворих на холангіоцелюлярний рак між високим рівнем експресії ММР-9 і низьким рівнем експресії ТІМР-1 пухлинними клітинами спостерігається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = -0,85$ відповідно).

При імуногістохімічному аналізі експресії адгезивно-міграційних маркерів пухлинними клітинами гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку, а також гепатоцитами поза межами пухлини отримані наступні результати. Проведені ІГХ дослідження експресії Е-кадгерину та β -катеніну в тканині печінки поза межами пухлин показали, що мембранна експресія Е-кадгерину (Рис.) притаманна нормальним гепатоцитам (рис.5.14). Рівень мембранної експресії Е-кадгерину в гепатоцитах коливається від високого ($156,23 \pm 33,15$ УООЩ) до помірного ($67,21 \pm 15,29$ УООЩ), у гепатоцитах нормальної печінки поза межами пухлин спостерігається високий ($147,51 \pm 28,73$ УООЩ) рівень цитоплазматично-мембранної експресії β -катеніну (рис.5.15).

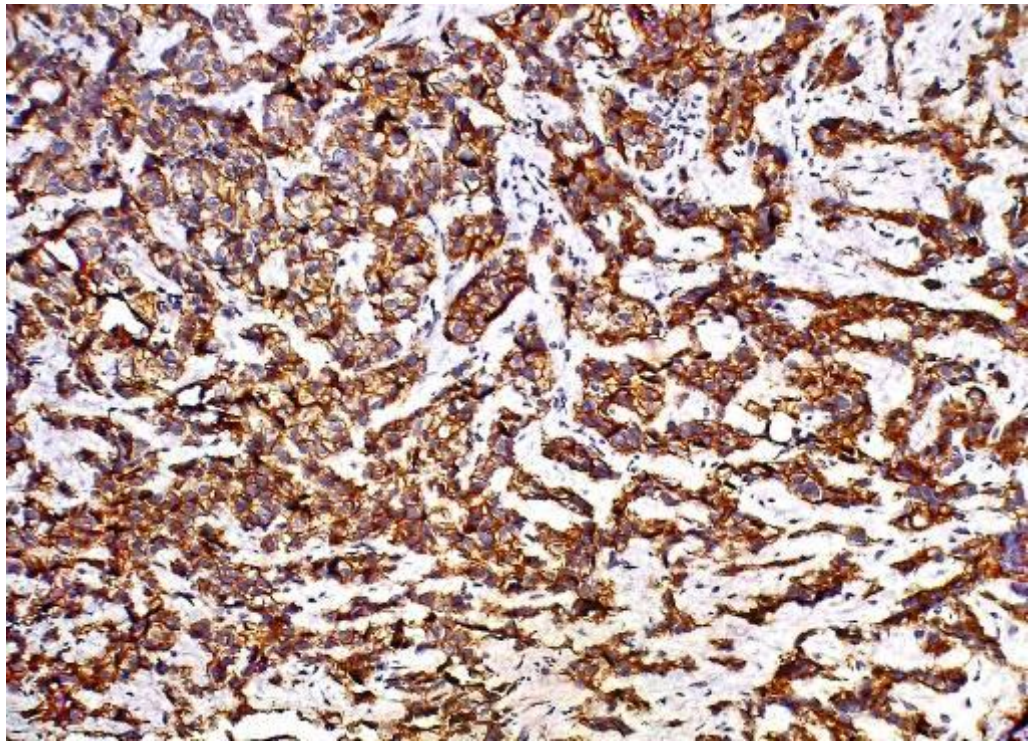


Рис. 5.14 Високий рівень мембранної експресії E-кадгерину в гепатоцитах поза пухлиною печінки. *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone NCH-38*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 300.

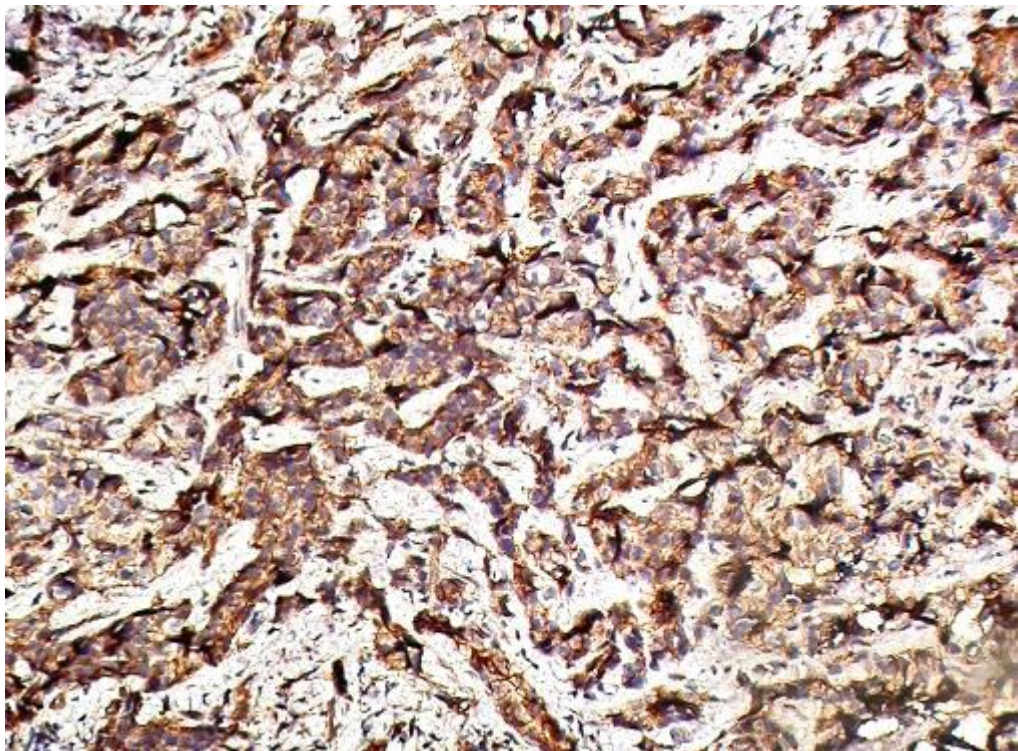


Рис. 5.15 Високий рівень цитоплазматично-мембранної експресії β -катеніну в гепатоцитах поза пухлиною печінки. *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 β -Catenin-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. х 300.

При ІГХ аналізі експресії Е-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного раку отримані наступні результати. У 36,36% хворих експресія Е-кадгерину в пухлинних клітинах гепатоцелюлярного раку не виявляється. З 63,64% хворих з Е-кадгерин-імунопозитивним гепатоцелюлярним раком печінки, мембранна експресія Е-кадгерину раковими клітинами (рис.5.16) визначалася у 27,28% пацієнтів, а мембрано-цитоплазматична експресія Е-кадгерину (рис.5.17) клітинами гепатоцелюлярного раку мала місце у 36,36% хворих. Високий ($145,7 \pm 43,15$ УООЩ) і помірний ($77,5 \pm 13,39$ УООЩ) рівень експресії Е-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного раку був встановлений у однакового відсотка (у 18,18%) хворих, низький рівень експресії цього глікопротеїну ($27,22 \pm 6,15$ УООЩ) визначався у 27,28% хворих на гепатоцелюлярний рак. Фотоцифрова морфометрія показала, що Е-кадгерин-імунопозитивні клітини займали в середньому $42,25 \pm 15,12\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку печінки (табл.5.5), що значно менше площі Е-кадгерин-імунопозитивних гепатоцитів в нормальній тканині печінки.

При аналізі експресії β -катеніну встановлено, що експресія цього білка в клітинах гепатоцелюлярного раку печінки виявляється у 94,55% хворих. З усіх пацієнтів з β -катенін-імунопозитивним гепатоцелюлярним раком, у 21,82% хворих визначалася одночасна мембранна, цитоплазматична і ядерна експресія β -катеніну в клітинах пухлини, у 50,91% пацієнтів була встановлена мембранна і цитоплазматична експресія цього маркера в злоякісних клітинах (рис.5.18), у 21,82% хворих визначалася переважно мембранна експресія β -катеніну в клітинах гепатоцелюлярного раку (рис.5.19). Високий рівень експресії β -катеніну клітинами ГЦР, що становив $156,58 \pm 39,21$ УООЩ, виявлявся у 52,73% хворих, помірний рівень експресії β -катеніну в ГЦР ($69,53 \pm 18,54$ УООЩ) встановлений у 30,91% пацієнтів, низький рівень експресії цього білка ($39,33 \pm 8,91$ УООЩ) визначався у 10,91% хворих (табл. 5.5).

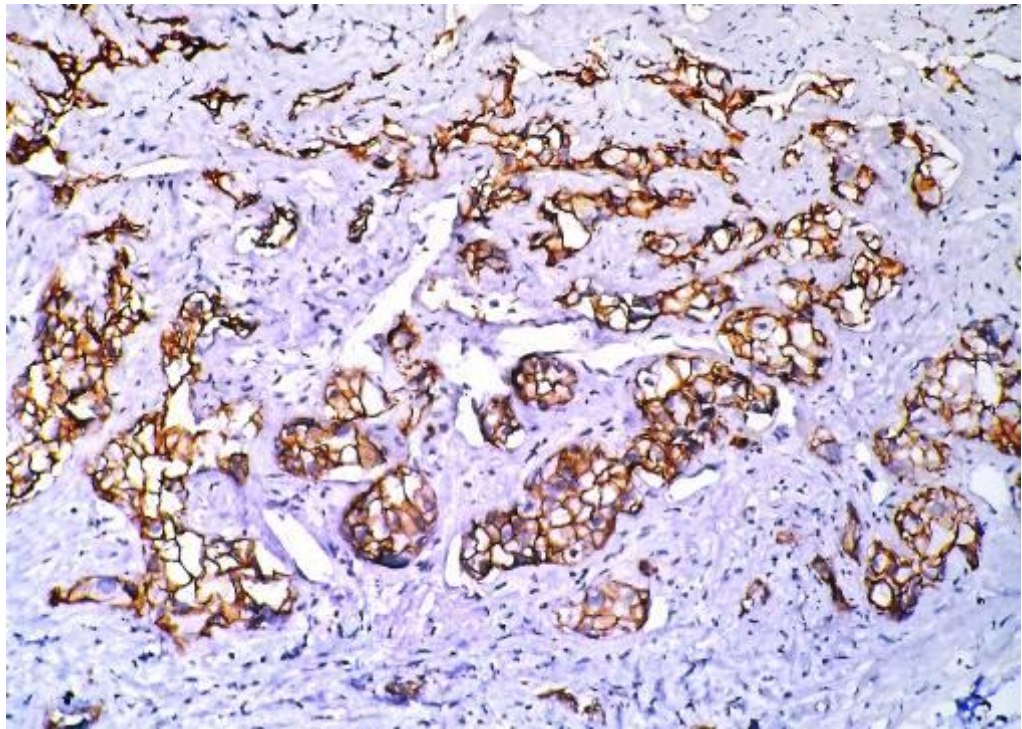


Рис. 5.16 Мембранна експресія Е-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного раку печінки. Мо *a-Hu E-Cadherin, Clone NCH-38*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. х 300.

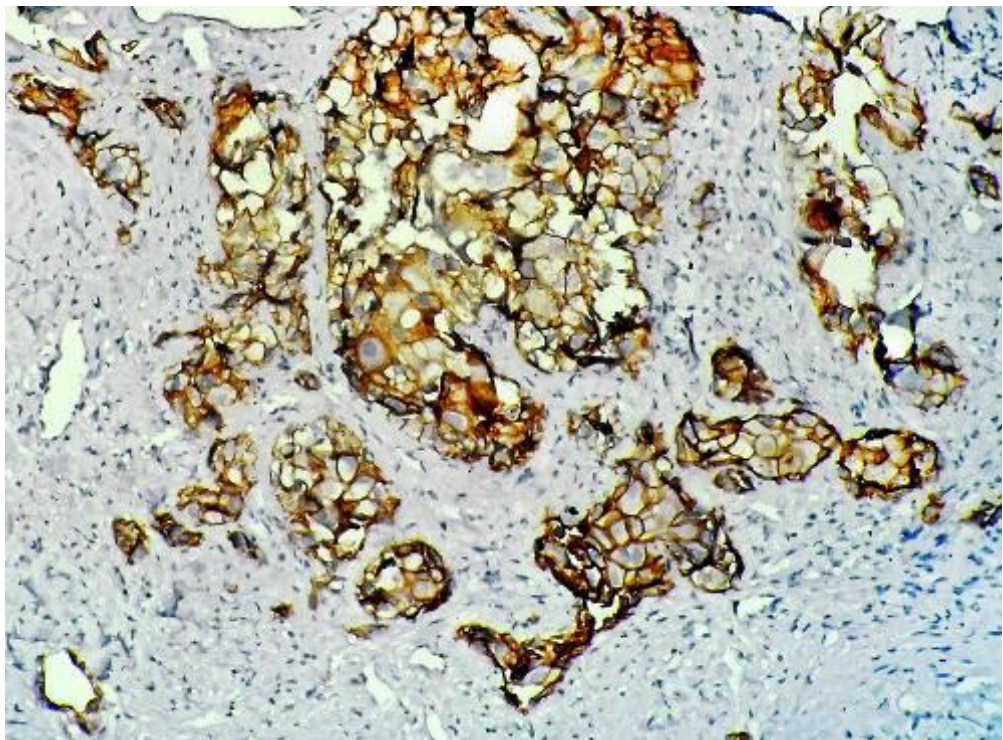


Рис. 5.17 Мембранно-цитоплазматична експресія Е-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного раку печінки. Мо *a-Hu E-Cadherin, Clone NCH-38*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. х 300.

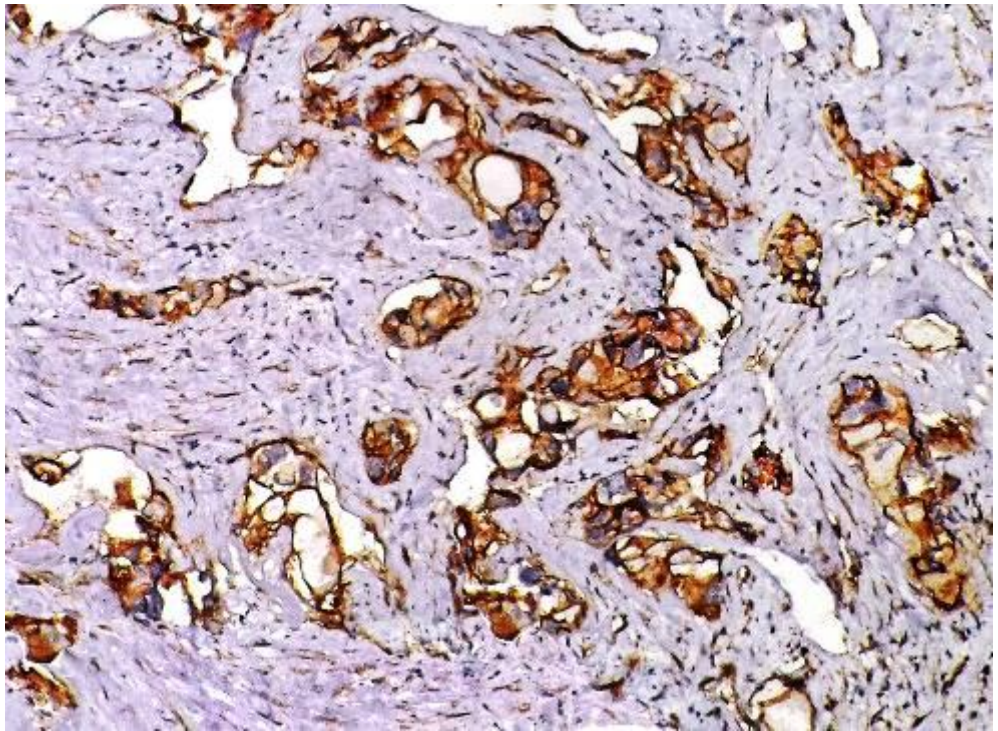


Рис. 5.18 Мембранно-цитоплазматична експресія β -катеніну клітинами гепатоцелюлярного раку печінки. *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 β -Catenin-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 400.

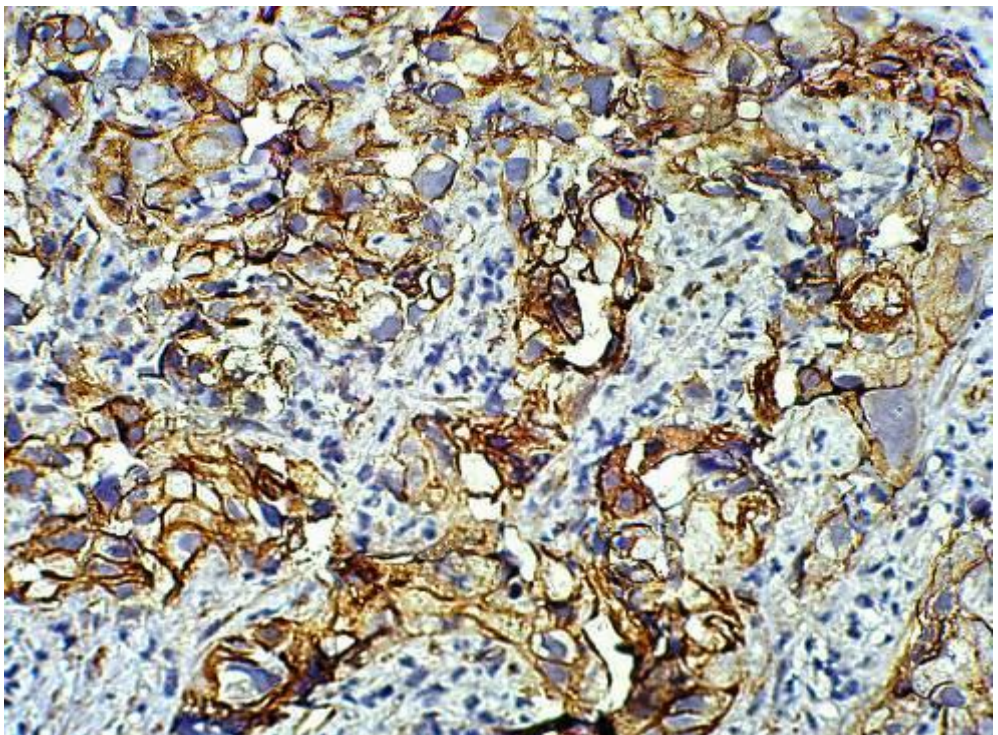


Рис. 5.19 Переважно мембранна експресія β -катеніну клітинами гепатоцелюлярного раку печінки. *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 β -Catenin-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 600.

При фотоцифровій морфометрії встановлено, що площа, яку займали β -катенін-імунопозитивні клітини, склала $62,39 \pm 20,41\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку, що значно більше площі, яку займають Е-кадгерин-імунопозитивні клітини. У той же час у $36,36\%$ хворих з негативною експресією Е-кадгерину визначався високий або помірний рівень β -катеніну. Між низьким рівнем експресії Е-кадгерину клітинами гепатоцелюлярного раку і високим рівнем експресії β -катеніну визначається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = -0,78$) (табл. 5.5).

Таблиця № 5.5

Характеристика експресії Е-кадгерину і β -катеніну клітинами гепатоцелюлярного раку печінки

Тип адгезивно-міграційних маркерів	Рівні експресії в УООЩ			Площа імунопозитивних клітин в пухлині (M±m)
	Високий (M±m)	Помірний (M±m)	Низький (M±m)	
Е-кадгерин	145,7±43,15	77,5±13,39	27,22±6,15*	42,25±5,12%
β -катенін	156,58±39,21*	69,53±18,54	39,33±8,91	62,39±20,41%
Коефіцієнт кореляції Пірсона r	-0,78			

Примітка: Знаком * позначено, між якими рівнями експресії Е-кадгерину і β -катеніну проводився кореляційний аналіз

При імуногістохімічному аналізі експресії адгезивно-міграційних маркерів в холангіоцелюлярному раку печінки експресія Е-кадгерину пухлинними клітинами виявлена у всіх хворих. Високий рівень експресії Е-кадгерину клітинами холангіоцелюлярного раку печінки, який склав $123,17 \pm 15,99$ УООЩ, виявлено у $43,59\%$ хворих, з яких у $58,97\%$ пацієнтів визначався високий рівень мембранної експресії цього глікопротеїну (рис.5.20), а у $41,03\%$ хворих - високий рівень мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину (рис.5.21). Помірний рівень експресії ($73,25 \pm 15,12$ УООЩ) Е-кадгерину клітинами ХЦР печінки визначений у $30,77\%$ пацієнтів,

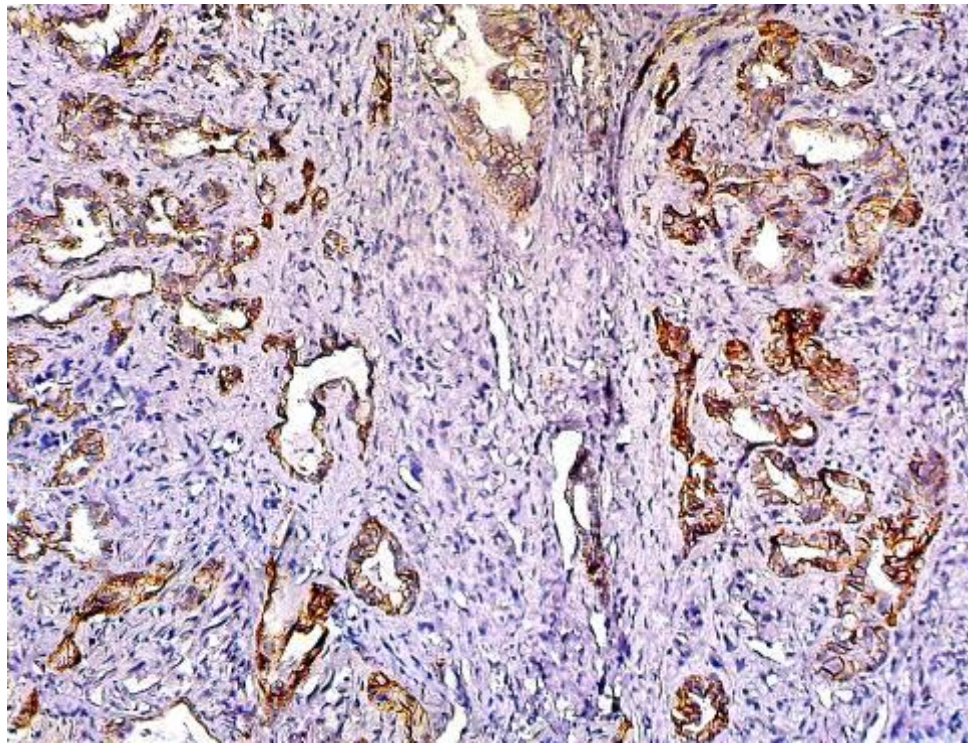


Рис. 5.20 Мембранна експресія Е-кадгерину клітинами холангіоцелюлярного раку печінки. *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone NCH-38*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. х 400.

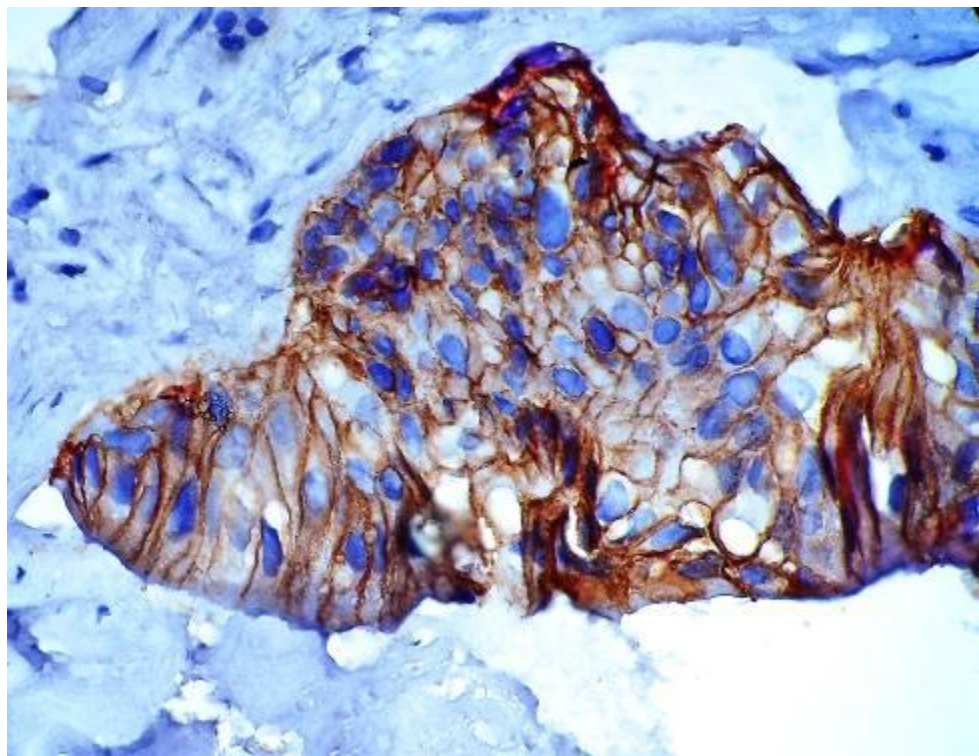


Рис. 5.21 Високий рівень мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину клітинами холангіоцелюлярного раку печінки. *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone NCH-38*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. Зб. х 600.

низький рівень експресії E-кадгерина ($35,45 \pm 9,32$ УООЩ) нами було виявлено у 25,64 % хворих. Площа E-кадгерин-імунопозитивних клітин склала $35,13 \pm 15,69\%$ СПГЗ тканини холангіоцелюлярного раку печінки.

Аналіз експресії пухлинними клітинами адгезивно-міграційних маркерів (табл.5.6) показав, що клітини гепатоцелюлярного раку печінки характеризуються втратою експресії E-кадгерину і зростанням аномальної ядерної та цитоплазматичної експресії β -катеніну, у порівнянні з гепатоцитами нормальної тканини печінки.

Таблиця № 5.6

Параметри експресії E-кадгерину і β -катеніну в гепатоцелюлярному раку печінки

Основні параметри експресії адгезивно-міграційних маркерів в пухлині	E-кадгерин	β -катенін
Відсоток хворих з експресією ферментів в пухлині	63,64%	94,55%
Площа імунопозитивних клітин в пухлині	$42,25 \pm 15,12\%$	$62,39 \pm 20,41\%$
Відсоток хворих з високим рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	18,18%	52,73%
Відсоток хворих з помірним рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	18,18%	30,91%
Відсоток хворих з низьким рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	27,28%	10,91 %

Проведені нами дослідження експресії E-кадгерину та β -катеніну показали, що в тканині печінки поза пухлиною мембранна експресія E-кадгерину спостерігалася в 100% клітин, що вистилають жовчовивідні протоки печінки. Рівень мембранної експресії E-кадгерину в біліарному епітелії коливався від високого ($134,15 \pm 29,37$ УООЩ) до помірного ($69,23 \pm 19,83$ УООЩ). В тканині печінки поза пухлиною у всіх епітеліальних клітинах жовчовивідних протоків спостерігався високий ($133,19 \pm 30,21$ УООЩ) рівень цитоплазматично-мембранної експресії β -катеніну.

У всіх хворих на холангіоцелюлярний рак печінки виявлена експресія β -катеніну злоякісними пухлинними клітинами. У більшості пацієнтів (у 62,5% хворих) в пухлинних клітинах визначається мембранна і цитоплазматична експресія β -катеніну (рис.5.22), у 31,25% хворих встановлена тільки мембранна експресія цього білка (рис.5.23) і у 6,25% пацієнтів виявляється мембранна, цитоплазматична і ядерна експресія β -катеніну в клітинах холангіоцелюлярного раку (рис.5.24). Високий рівень експресії β -катеніну злоякісними клітинами, що становить $143,91 \pm 33,52$ УООЩ, виявлений у 56,25% хворих на холангіоцелюлярний рак печінки, помірний рівень експресії β -катеніну ($67,42 \pm 16,39$ УООЩ) пухлинними клітинами спостерігався у 31,25 % пацієнтів, низький рівень експресії β -катеніну ($39,74 \pm 8,12$ УЕОП) в клітинах холангіоцелюлярного раку печінки визначався у 12,5% хворих (табл.5.7). При фотоцифровій морфометрії встановлено, що β -катенін-імунопозитивні пухлинні клітини займали в середньому $55,83 \pm 19,67\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку. Між низьким рівнем експресії Е-кадгерину клітинами ХЦР і високим рівнем експресії β -катеніну клітинами ХЦР визначається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = -0,99$) (табл.5.7).

Таблиця № 5.7

Характеристика експресії Е-кадгерину і β -катеніну клітинами холангіоцелюлярного раку печінки

Тип адгезивно-міграційних маркерів	Рівні експресії в УООЩ			Площа імунопозитивних клітин в пухлині (M±m)
	Високий (M±m)	Помірний (M±m)	Низький (M±m)	
Е-кадгерин	123,17±15,99	73,25±15,12	35,45±9,32*	35,13±15,69
β -катенін	143,91±33,52*	67,42±16,39	39,74±8,12	55,83±19,67
Коефіцієнт кореляції Пірсона r	-0,99			

Примітка: Знаком * позначено, між якими рівнями експресії Е-кадгерину і β -катеніну проводився кореляційний аналіз

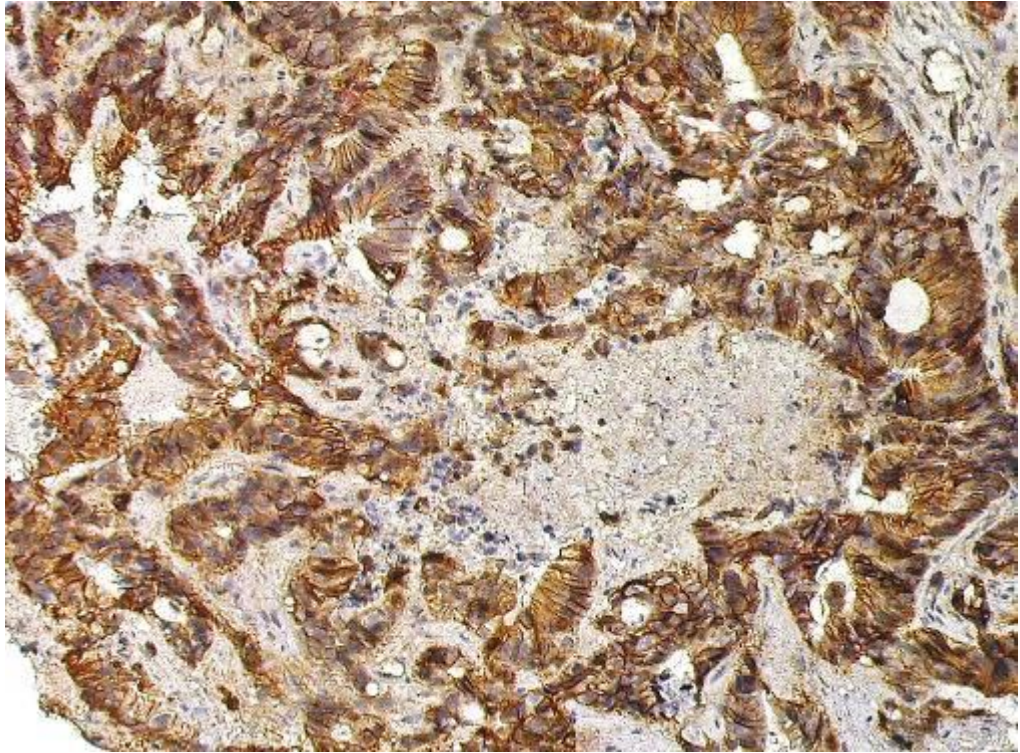


Рис. 5.22 Мембранна експресія β -катеніну в клітинах холангіоцелюлярного раку печінки. *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 β -Catenin-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 200.

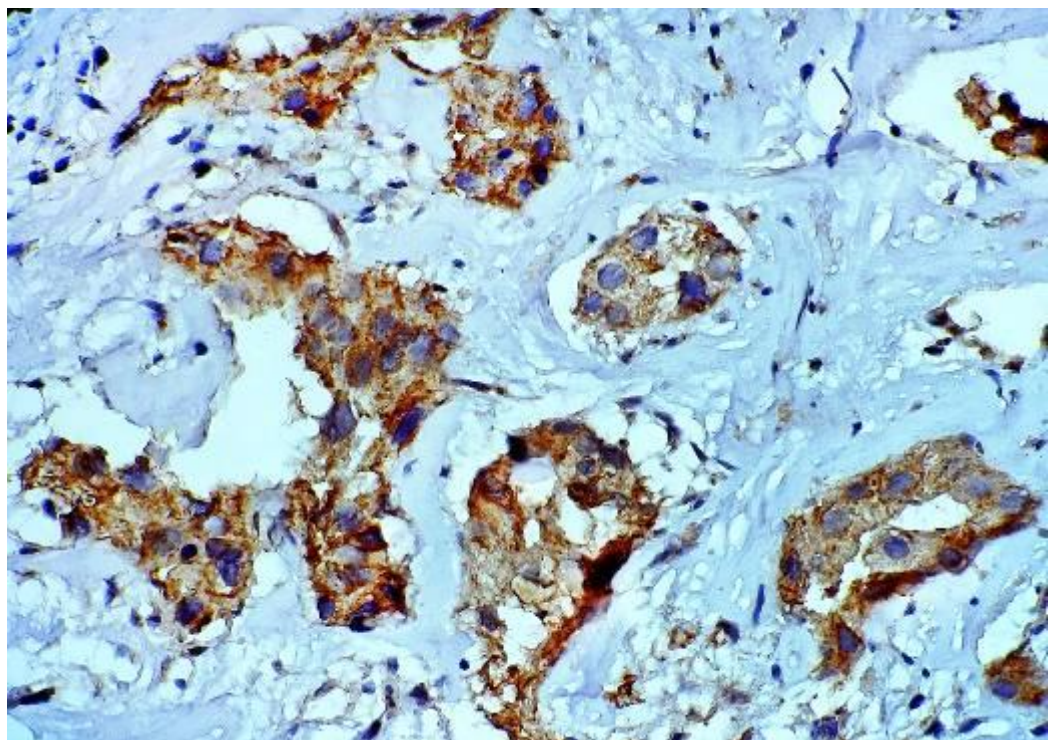


Рис. 5.23 Мембранна і цитоплазматична експресія β -катеніну в клітинах холангіоцелюлярного раку печінки. *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 β -Catenin-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 3б. x 600.

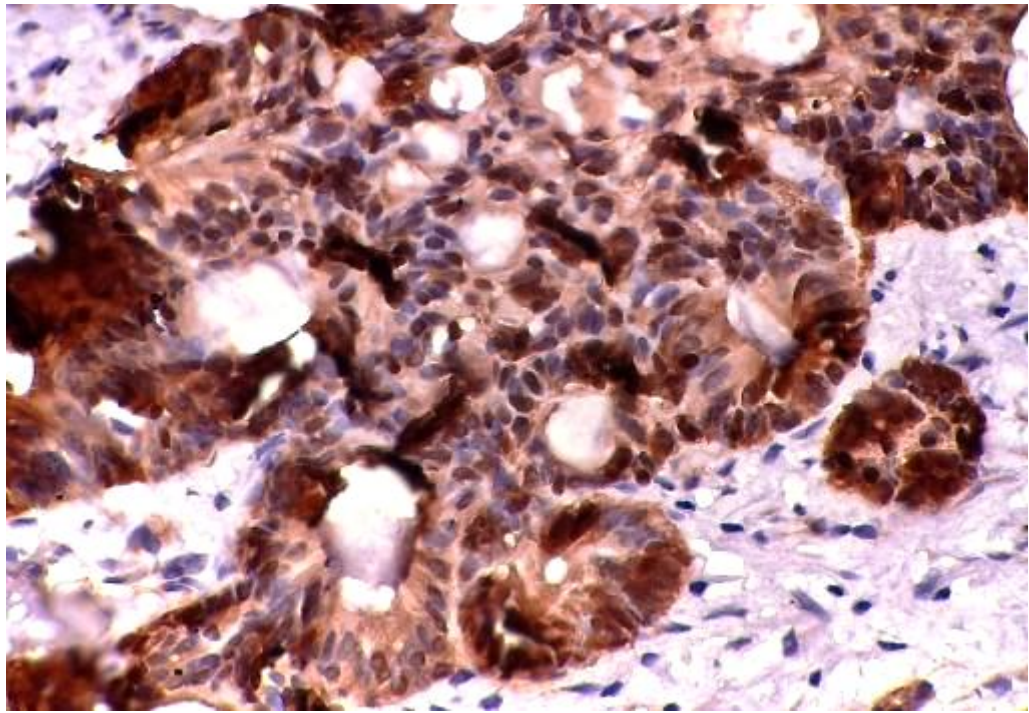


Рис. 5.24 Мембранно-цитоплазматична і ядерна експресія β -катеніну в клітинах холангіоцелюлярного раку. *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 β -Catenin-1*, система візуалізації DAKO EnVision+System з DAB. 36×600 .

Проведений аналіз експресії пухлинними клітинами адгезивно-міграційних маркерів (табл.5.8) показує, що клітини холангіоцелюлярного раку печінки характеризуються втратою експресії E-кадгерину і зростанням аномальної ядерної та цитоплазматичної експресії β -катеніну, у порівнянні з біліарним епітелієм нормальної тканини печінки.

Таблиця № 5.8

Параметри експресії E-кадгерину і β -катеніну в холангіоцелюлярному раку печінки

Основні параметри експресії адгезивно-міграційних маркерів в пухлині	E-кадгерин	β -катенін
Відсоток хворих з експресією ферментів в пухлині	100%	100%
Площа імунопозитивних клітин в пухлині	35,13 \pm 15,69%	55,83 \pm 19,67%
Відсоток хворих з високим рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	43,59 %	56,25%
Відсоток хворих з помірним рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	30,77%	31,25%
Відсоток хворих з низьким рівнем експресії ферментів клітинами пухлини	25,64%	12,5%

5.3 Морфометричний аналіз середньої площі p53-, каспаза-3-, Ki67-, MMP-9-, TIMP-1-, β -катенін-, E-кадгерин- імунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку печінки різного розміру

Враховуючи дуже значну варіабельність інтенсивності експресії пухлинними клітинами всіх вивчених імуногістохімічних маркерів, а також значну нерівномірність розподілу імунопозитивних клітин в різних ділянках пухлин проведено порівняльний аналіз середніх площ, займаних імунопозитивними клітинами за даними фотоцифрової морфометрії, в гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку розміром менше і більше 5 см. Розмір пухлини у хворого визначався при ультразвуковому дослідженні печінки перед трепанобіопсією.

Результати порівняльного морфометрично-імуногістохімічного аналізу гепатоцелюлярного раку печінки різного розміру наведені в таблиці 5.9. За даними фотоцифрової морфометрії в гепатоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см p53-імунопозитивні клітини займали $32,95 \pm 12,79\%$ СПГЗ пухлинної тканини, а в ГЦР розміром більше 5-ти см - $65,36 \pm 21,03\%$ площі зрізу пухлини. Площа каспаза-3-імунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см становила $49,12 \pm 18,42\%$ СПГЗ пухлинної тканини, а в ГЦР розміром більше 5-ти см - $50,91 \pm 17,74\%$ СПГЗ пухлини. Ki67-позитивні клітини в гепатоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см займали $47,37 \pm 5,13\%$ СПГЗ пухлини, а в ГЦР розміром більше 5-ти см - $65,18 \pm 7,21\%$ СПГЗ пухлини. В гепатоцелюлярному раку діаметром менше 5-ти см MMP-9-позитивні клітини займали $43,24 \pm 6,15\%$ СПГЗ пухлини, в ГЦР розміром більше 5-ти см - $70,17 \pm 11,82\%$ СПГЗ пухлинної тканини. Площа, яку займали TIMP-1-імунопозитивні клітини в гепатоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см, становила $21,47 \pm 3,54\%$ СПГЗ пухлини, а в ГЦР розміром більше 5-ти см - $22,15 \pm 5,97\%$ СПГЗ раку печінки.

**Характеристика площі p53, каспаза-3, Ki-67, MMP-9 і TIMP-1-
імунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному раку печінки різного
розміру**

Параметри експресії маркерів в пухлині різного розміру	Площа імунопозитивних клітин в пухлині % (M±m)				
	p53	каспаза-3	Ki-67	MMP-9	TIMP-1
Гепатоцелюлярний рак печінки розміром до 5 см (А)	32,95±12,79	49,12±18,42	47,37±5,13	43,24±6,15	21,47±3,54
Гепатоцелюлярний рак печінки розміром більше 5 см (В)	65,36±21,03*	50,91±17,74	65,18±7,21*	70,17±11,82*	22,15±5,97

Примітка: знаком * позначено достовірну різницю ($p < 0,05$) в порівнянні з А.

Таким чином, проведені дослідження показали, що у великому гепатоцелюлярному раку розміром більше 5-ти см, в порівнянні з дрібним (діаметром менше 5-ти см) ГЦР, визначається статистично достовірно вища площа пухлинних клітин з ядерною експресією Ki67 (в 1,4 рази) і p53 (майже в 2 рази), та клітин з експресією MMP-9 (в 1,6 рази), а площі, займані каспаза-3-позитивними та TIMP-1-позитивними клітинами, в ГЦР різного розміру статистично достовірно не відрізняються (табл.5.9). Це свідчить про те, що при збільшенні розмірів гепатоцелюлярного раку в ньому зростає проліферативна активність ракових клітин; дисбаланс між вдвічі збільшеною експресією p53 і незмінною експресією каспази-3 підтверджує зменшення процесів апоптотичного знищення ракових клітин у великій пухлині. При збільшенні розмірів гепатоцелюлярного раку в ньому створюються умови для інвазивного розповсюдження пухлинних клітин, про що свідчить зростання в 1,6 разів у великому ГЦР площі клітин з експресією матриксної металоротеїнази-9 на тлі незмінної площі клітин з експресією її інгібітора TIMP-1.

Проведений порівняльний аналіз показав, що середня площа Е-кадгерин-імунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному раку діаметром

менше 5-ти см статистично достовірно ніж у 1,8 рази більша, ніж в ГЦР розміром більше 5-ти см; в той час як площа β -катенін-імунопозитивних клітин в ГЦР розміром більше 5-ти см статистично достовірно майже в 1,8 рази більша, ніж в в ГЦР діаметром менше 5-ти см (табл. 5.10). Тобто, площа Е-кадгерин- і β -катенін-імунопозитивних клітин пов'язана з розміром гепатоцелюлярного раку: в більшій пухлині статистично достовірно меншу площу займали Е-кадгерин-імунопозитивні клітини і більшу площу займали β -катенін-імунопозитивні клітини.

Таблиця № 5.10

Характеристика площі Е-кадгерин- і β -катенін-імунопозитивних клітин в гепатоцелюлярному раку печінки різного розміру

Параметри експресії маркерів в пухлині різного розміру	Площа Е-кадгерин імунопозитивних клітин в пухлині (M \pm m)	Площа β -катенін імунопозитивних клітин в пухлині (M \pm m)
Гепатоцелюлярний рак печінки до 5 см в діаметрі (А)	53,22 \pm 5,75	40,29 \pm 11,21
Гепатоцелюлярний рак печінки розміром більше 5 см (В)	28,18 \pm 10,12*	70,19 \pm 9,97*

Примітка: Знаком * позначено достовірна різниця ($p < 0,05$) в порівнянні з А.

Відповідно до отриманих нами результатів, зменшення площі клітин з експресією Е-кадгерину при одночасному збільшенні площі β -катенін-позитивних клітин в крупному гепатоцелюлярному раку розмірами більше 5см свідчить про зниження в ньому міжклітинних адгезійних зв'язків і про зростання інвазивних властивостей пухлинних клітин в порівнянні з раком меншого розміру.

Результати порівняльного морфометрично-імуногістохімічного аналізу холангіоцелюлярного раку печінки різного діаметру наведені в таблиці 5.11. За даними фотоцифрової морфометрії в холангіоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см р53-імунопозитивні клітини займали

35,23±12,94% СПГЗ пухлинної тканини, в ХЦР діаметром більше 5 см - 62,57±16,02% СПГЗ раку печінки. Площа, займана каспаза-3-імунопозитивними клітинами в ХЦР печінки діаметром менше 5-ти см становила 46,49±21,15% СПГЗ пухлинної тканини, в ХЦР розміром більше 5-ти см - 48,11±17,54% СПГЗ пухлини. В холангіоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см Кі67-імунопозитивні клітини займали 45,03±12,17% СПГЗ пухлини, в ХЦР розміром більше 5-ти см - 64,87±11,51% СПГЗ тканини раку печінки. Площа, займана ММР-9-позитивними клітинами в холангіоцелюлярному раку печінки менше 5-ти см становила 47,85±15,12% СПГЗ пухлини, а в ХЦР діаметром більше 5-ти см - 62,93±10,51% зрізу ракової тканини. В холангіоцелюлярному раку печінки діаметром менше 5-ти см площа ТІМР-1-імунопозитивних клітин становила 32,47±13,71% СПГЗ пухлини, а в ХЦР більше 5-ти см - 33,12±12,86% площі зрізу раку печінки (табл. 5.11).

Таблиця № 5.11

Характеристика площі p53, каспаза-3, Кі-67, ММР-9 і ТІМР-1-імунопозитивних клітин в холангіоцелюлярному раку печінки різного розміру

Параметри експресії маркерів в пухлині різного розміру	Площа імунопозитивних клітин в пухлині % (M±m)				
	p53	каспаза-3	Кі-67	ММР-9	ТІМР -1
Холангіоцелюлярний рак печінки до 5 см в діаметрі (А)	35,23±12,94	46,49±21,15	45,03±12,17	47,85±15,12	33,12±12,86
Холангіоцелюлярний рак печінки розміром більше 5 см (Б)	62,57±16,02 #	48,11±17,54	64,87±11,51 #	62,93±10,51 #	32,47±13,71

Примітка: знаком # позначено достовірна різниця (p <0,05) в порівнянні з А.

Таким чином, результати порівняльного аналізу параметрів холангіоцелюлярного раку різного розміру, наведені в таблиці 5.11, свідчать про те, що при збільшенні розмірів холангіоцелюлярного раку в ньому

статистично достовірно зростає (в 1,4 рази) проліферативна активність пухлинних клітин та зменшується їх апоптоз (ядерна експресія p53 зростає в 1,8 рази, а експресія каспази-3 збільшується статистично не достовірно). Одночасно ракові клітини холангіоцелюлярного раку отримують сприятливі умови для інвазивного розповсюдження, про що свідчить статистично достовірне зростання (в 1,3 рази) експресії ними матриксної металопротеїнази-9 на тлі незмінного рівня експресії її тканинного інгібітора TIMP-1.

Результати порівняльного аналізу, викладені в таблиці 5.12, показали, що площа E-кадгерин- і β -катенін-імунопозитивних клітин також пов'язана з розміром холангіоцелюлярного раку печінки.

Таблиця № 5.12

Характеристика площі E-кадгерин- і β -катенін-імунопозитивних клітин в холангіоцелюлярному раку печінки різного розміру

Параметри експресії маркерів в пухлині різного розміру	Площа E-кадгерин імунопозитивних клітин в пухлині (M \pm m)	Площа β -катенін імунопозитивних клітин в пухлині (M \pm m)
Холангіоцелюлярний рак печінки до 5 см в діаметрі (А)	45,28 \pm 5,25	38,24 \pm 3,89
Холангіоцелюлярний рак печінки розміром більше 5 см (Б)	20,12 \pm 2,12#	63,95 \pm 12,91#

Примітка: Знаком # позначено достовірну різниця (p <0,05) в порівнянні з А.

Наведені у таблиці 5.12 дані демонструють таку особливість: у більшому за розміром холангіоцелюлярному раку меншу площу займають E-кадгерин-імунопозитивні клітини і більшу площу займають β -катенін-імунопозитивні клітини (у порівнянні з аналогічною дрібною пухлиною). В холангіоцелюлярному раку діаметром більше 5 ти см площа E-кадгерин-імунопозитивних клітин статистично достовірно в 2,25 рази менша, ніж в ХЦР діаметром до 5-ти см, а площа β -катенін-імунопозитивних клітин

статистично достовірно майже в 1,7 разів вища, ніж в ХЦР діаметром менше 5-ти см (див.табл. 5.12).

Резюме.

У 89,1% хворих в гепатоцелюлярному раку печінки визначається помірний та високий рівень ядерної експресії Ki67 злюкисними клітинами, Ki67-іммунопозитивні клітини в середньому займають $57,18 \pm 15,92\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку. В клітинах гепатоцелюлярного раку виявляється гіперекспресія ядерного білка p53, визначена у 61,82% хворих, та високий рівень експресії p53, встановлений у 21,82% пацієнтів. За даними фотоцифрової морфометрії середня площа p53-імунопозитивних клітин становила $53,12 \pm 33,29\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку. У той же час, в гепатоцелюлярному раку переважає слабкий рівень цитоплазматичної експресії ферменту апоптотичної деградації каспази-3 пухлинними клітинами, який був визначений у 47,28% хворих. Високий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 клітинами гепатоцелюлярного раку виявлений у 27,27% пацієнтів, а помірний рівень експресії каспази-3 пухлинними клітинами був виявлений у 25,45% хворих. При фотоцифровій морфометрії встановлено, що каспаза-3-імунопозитивні клітини з різним рівнем експресії цього ферменту в середньому займали $49,22 \pm 19,76\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку.

Встановлено, що у пацієнтів, у яких визначається гіперекспресія p53, має місце слабкий або помірний рівень експресії каспази-3.

Помірний і високий рівень експресії Ki67 клітинами холангіоцелюлярного раку встановлений у 74,36% хворих, Ki67 імунопозитивні клітини займали $54,21 \pm 22,18\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку. У 41,03% хворих в пухлинних клітинах визначається гіперекспресія ядерного білка p53, у 20,51% пацієнтів – високий рівень ядерної експресії цього онкогенного білка. p53-імунопозитивні пухлинні клітини займали $50,45 \pm 28,15\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки. Водночас, у 48,72%

хворих на холангіоцелюлярний рак рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 пухлинними клітинами був низьким, у 23,08% пацієнтів в пухлині виявлено помірний рівень ядерно-цитоплазматичної експресії каспази-3; каспаза-3-імунопозитивні пухлинні клітини займали $45,74 \pm 20,15\%$ СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки.

У 92,73% хворих гепатоцелюлярним раком печінки і у 89,74% хворих холангіоцелюлярним раком печінки в злоякісних клітинах визначалася цитоплазматична експресія MMP-9. MMP-9 імунопозитивні клітини становили $59,33 \pm 22,57\%$ СПГЗ тканини гепатоцелюлярного раку і $52,71 \pm 20,86\%$ площі зрізу тканини холангіоцелюлярного раку печінки. У 80% хворих в гепатоцелюлярному раку та у 74,36% хворих в холангіоцелюлярному раку в пухлинних клітинах виявлена цитоплазматична експресія TIMP-1. TIMP-1 імунопозитивні клітини становили $21,94 \pm 6,27\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку печінки і $33,05 \pm 13,85\%$ СПГЗ тканини холангіоцелюлярного раку печінки. В обох типах раку між високим рівнем експресії пухлинними клітинами MMP-9 і низьким рівнем експресії TIMP-1 зазначається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = -0,67$ і $r = -0,85$ відповідно), що свідчить про високий інвазивний потенціал цих пухлин.

У 63,64% хворих на гепатоцелюлярний рак і у 100% хворих на холангіоцелюлярний рак печінки в злоякісних клітинах визначається мембранна або мембранно-цитоплазматична експресія E-кадгерину. E-кадгерин імунопозитивні клітини складають $42,25 \pm 15,12\%$ СПГЗ тканини гепатоцелюлярного раку і $35,13 \pm 15,69\%$ СПГЗ тканини холангіоцелюлярного раку печінки. В 94,55% випадків гепатоцелюлярного раку та у 100% хворих холангіоцелюлярним раком печінки в пухлинних клітинах виявлена мембранна експресія β -катеніну, що поєднується з цитоплазматичною або ядерною експресією цього білка. β -катенін імунопозитивні клітини складають $62,39 \pm 20,41\%$ СПГЗ тканини гепатоцелюлярного раку печінки і $55,83 \pm 19,67\%$ СПГЗ тканини холангіоцелюлярного раку печінки. У гепатоцелюлярному і холангіоцелюлярному раку між низьким рівнем

експресії пухлинними клітинами E-кадгерину і високим рівнем експресії β -катеніну визначається зворотній сильний зв'язок (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = -0,78$ і $r = -0,99$ відповідно). Аналіз експресії пухлинними клітинами адгезивно-міграційних маркерів показав, що клітини гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки характеризуються втратою експресії E-кадгерину і зростанням аномальної ядерної та цитоплазматичної експресії β -катеніну (у порівнянні з гепатоцитами і біліарним епітелієм нормальної тканини печінки).

При збільшенні розмірів гепатоцелюлярного раку в ньому зростає проліферативна активність ракових клітин та зменшується процес їх апоптотичного знищення. У великому гепатоцелюлярному раку діаметром більше 5-ти см, в порівнянні з дрібним (менше 5-ти см) ГЦР, визначається статистично достовірно в 1,4 рази вища площа пухлинних клітин з ядерною експресією Ki67 і майже в 2 рази вища площа p53-позитивних клітин, а площа, займані каспаза-3-позитивними клітинами, в ГЦР різного розміру статистично достовірно не відрізняються. При збільшенні розмірів гепатоцелюлярного раку в ньому створюються умови для інвазивного розповсюдження пухлинних клітин, про що свідчить зростання в 1,6 разів у великому ГЦР площі клітин з експресією матриксної металоротеїнази-9 на тлі незмінної площі клітин з експресією її інгібітора TIMP-1.

При збільшенні розмірів холангіоцелюлярного раку більше 5 ти см в ньому статистично достовірно зростає (в 1,4 рази) проліферативна активність пухлинних клітин та зменшується їх апоптоз (ядерна експресія p53 зростає в 1,8 рази, а експресія каспази-3 збільшується статистично не достовірно). В холангіоцелюлярному раку діаметром більше 5 ти см площа E-кадгерин-імунопозитивних клітин статистично достовірно в 2,25 рази менша, ніж в ХЦР діаметром до 5-ти см, а площа β -катенін-імунопозитивних клітин статистично достовірно майже в 1,7 разів вища, ніж в ХЦР діаметром менше 5-ти см. Одночасно ракові клітини холангіоцелюлярного раку отримують сприятливі умови для інвазивного розповсюдження, про що свідчить

статистично достовірне зростання (в 1,3 рази) експресії ними матриксної металопротеїнази-9 на тлі незмінного рівня експресії її тканинного інгібітора TIMP-1.

Таким чином, порівняльний аналіз площ клітин, імунопозитивних по експресії маркерів проліферації та апоптозу, маркерів міжклітинної адгезії та експресії ферментів, що розщеплюють міжклітинний матрикс, в пухлинах різних розмірів показує, що збільшення розмірів гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку супроводжується підвищенням рівня проліферації пухлинних клітин, гіперекспресією ядерного онкопротеїну p53 з блокуванням апоптозу ракових клітин, втратою пухлинними клітинами міжклітинних адгезивних зв'язків і зростанням експресії металопротеїнази-9, що в сукупності сприяє швидкому агресивному і інвазивному росту цих пухлин у печінці.

Матеріалу розділу відображені у роботах [14, 18, 19, 34, 35, 40-42].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проведені комплексні патогістологічні, імуногістохімічні та морфометричні дослідження показали, що гепатоцелюлярному раку печінки притаманна значна варіабельність мікроструктури. При мікроскопії трепанобіоптатів в ГЦР у одного й того ж хворого може виявляться декілька гістоархітектонічних патернів: трабекулярний, солідно-клітинний, ацинарний (або псевдозалозистий), циротичний, які не мають певної клінічної симптоматики і впорядкованого розподілу. Такі патерни в гепатоцелюлярній карциномі узаконені в міжнародній класифікації пухлин травної системи ВООЗ 2010 року [254]. Крім цього, за переважаючою структурою клітин можна виділити світлоклітинний, везикулярноклітинний, веретенноклітинний, гігантноклітинний і поліморфноклітинний варіанти пухлини. Значний мікроскопічний поліморфізм гепатоцелюлярної карциноми у різних її ділянках у одного і того ж хворого також зазначає більшість патологів [137, 186, 244].

Мабуть значна варіабельність ГЦР є причиною відсутності до теперішнього часу сучасної градації ГЦР для застосування в біопсійній практиці [140]. Для ГЦР використовується градація ступеню гістологічного диференціювання (G – Grading) пухлини, що була розроблена Н.А. Edmondson, Р.Е. Steiner ще у 1954 році на аутопсійному матеріалі [97] та підтверджена в 2009 році TNM-класифікацією Міжнародного протиракового союзу (International Union Against Cancer) та Американським об'єднаним комітетом по раку (American Joint Committee on Cancer) [51, 237].

При патоморфологічному аналізі трепанобіоптатів пухлин нами визначено, що у G1 високодиференційованому гепатоцелюлярному раку виявляються класичні солідноклітинні, трабекулярні і ацинарні патерни. Помірно диференційований G2 гепатоцелюлярний рак представлений фіброзним і циротичним варіантами пухлини. Низько диференційований G3 і

недиференційований G4 гепатоцелюлярний рак визначають скірозні, веретенноклітинні, поліморфноклітинні і гігантоклітинні варіанти пухлин та відсутність трабекулярних і ацинарних структур. Ці результати збігаються з даними N. Shafizadeh, S. Kakar [231] щодо високодиференційованого ГЦР, які підтвердили, що йому притаманні класичні гістоморфологічні особливості: добре виражена васкуляризація пухлини, широкі трабекули з більш ніж 3-х клітин, виражений ацинарний патерн, наявність дрібних клітин з цитологічною атипією, наявність мітозів, судинна інвазія, відсутність клітин Купфера і втрата ретикулінової мережі.

Значна мікроструктурна варіабельність ГЦР обумовлює високу актуальність ІГХ досліджень в діагностиці цього раку в трепанобіоптатах печінки, особливо важливих у тих випадках, коли в біоптат не попадають типові патерни цієї пухлини. Виконані нами ІГХ дослідження продемонстрували, що для ГЦР характерним є імунофенотип HerPar 1 + | AFP + | CK7 +/- | CK8 + | CK19 +/- | CK20 +/- | CA125- | CA19-9 +/- | CDX2- | MUC1- | MUC5AC-. Застосування в ІГХ аналізі ГЦР панелі антитіл до HerPar-1, AFP, CK7, CK20 показало наступне.

HerPar-1 (гепатоцити парафін-1) являє собою моноклональне антитіло, яке реагує з ферментом карбаміл-фосфатсінтазою-1 циклу сечовини в мітохондріях печінки [138,247], а також з мітохондріями епітелію каналців нирок і кишкового епітелію [43]. Нами визначено, що дифузна, гранулярна експресія HerPar-1-антигену визначається в цитоплазмі пухлинних і нормальних (диференційованих) гепатоцитів. Експресія HerPar-1 клітинами ГЦР раку печінки виявляється у 92,45% хворих; при цьому у 54,72% пацієнтів визначається високий рівень експресії HerPar-1 пухлинними клітинами, у 22,64% хворих - помірний рівень експресії цього маркера, у 1,51% пацієнтів - низький рівень експресії HerPar-1 клітинами ГЦР печінки, у 0,75% хворих вкрай низький рівень експресії HerPar-1 в пухлині склав $14,77 \pm 4,71$ був оцінений як негативний. Це відповідає даним інших патологів, які виявляли позитивну експресію HerPar-1 у 80-90% хворих на

ГЦР [53, 138]. Слід враховувати, що HerPar-1 проявляє низьку чутливість в низькодиференційованому ГЦР [53, 138], а також не виявляється в склерозуючому варіанті ГЦР [53].

Нами встановлена неоднорідність розподілу в пухлині HerPar-1-позитивних клітин. У солідноклітинному патерні пухлини вогнища імунонегативних клітин змінюються вогнищами імунопозитивних клітин з різним рівнем цитоплазматичної експресії HerPar-1, який варіює від високого до вкрай низького. У трабекулярному паттерні пухлини між імунонегативними клітинами розташовуються групи HerPar-1-позитивних клітин з однаково високим рівнем експресії цього маркера в цитоплазмі, або визначаються вогнищеві скупчення пухлинних клітин з різним рівнем експресії HerPar-1. З урахуванням осередкового і неоднорідного розподілу HerPar-1-позитивних клітин в ГЦР раку важливе діагностичне значення набуває середня щільність розподілу імунопозитивних клітин у пухлині. При фотоцифровій морфометрії нами встановлено, що середня площа, займана HerPar-1-імунопозитивними клітинами, становить $49,35 \pm 25,45\%$ СПГЗ ГЦР. Деякі дослідники вважають достатньою для діагностики ГЦР виявлення помірної або сильної експресії HerPar-1 не менш ніж у 10% пухлинних клітин [253].

Проведені нами ІГХ дослідження показали, що у 81,13% хворих на ГЦР печінки в злоякісних клітинах визначається цитоплазматична і ядерна експресія α -фетопроतेїну, який вважається специфічним для гепатоцитарного диференціювання злоякісних пухлинних клітин. Припускається, що в ГЦР з порушеними міжклітинно-матриксними взаємодіями і зниженим рівнем диференціювання нових поколінь пухлинних клітин, з'являються ембріоспецифічні клітини, що відновлюють синтез AFP [3]. За нашими даними рівень експресія AFP клітинами ГЦР у 37,74% пацієнтів був високим, у 26,42% хворих був помірним, у 16,97% пацієнтів рівень експресії цього печінкового глікопротеїну був низьким, у 18,87% хворих відзначена імунонегативна реакція. Площа AFP-імунопозитивних клітин в ГЦР в середньому становила $37,25 \pm 15,47\%$ СПГЗ пухлини.

Літературні дані про рівень експресії AFP суперечливі. Одні патологи вказують на високий рівень експресії AFP в гепатоцелюлярному раку [43], інші відзначають вогнищевий характер експресії AFP, який виявляється в 17% -61,5% ГЦК, а також низьку чутливість пухлини до цього маркера [54]. Виконаний нами кореляційний аналіз показав, що у хворих на ГЦР спостерігається прямий слабкий зв'язок між рівнем експресії клітинами пухлини AFP і HerPar-1 (коефіцієнт Пірсона $r = +0,25$).

Традиційно вважається, що гепатоцити і ГЦР позитивні для СК8 і СК18 [10], а також негативні для СК7 і СК20. При ІГХ дослідженні експресії цитокератинів нами було встановлено, що експресія СК7 клітинами гепатоцелюлярного раку була негативною у 62,26% пацієнтів та позитивною у 37,74% хворих, у яких СК7-позитивні клітини розподілялися в пухлини у вигляді осередкових скупчень. За даними фотоцифрової морфометрії середня площа СК7-імунопозитивних клітин в ГЦР становила всього $21,08 \pm 5,19\%$ СПГЗ пухлини. У 22,64% хворих визначався низький рівень експресії СК7 клітинами ГЦР, у невеликого відсотку (4,73%) хворих виявлявся високий рівень експресії СК7 клітинами ГЦР. Експресія СК20 виявлена у 30,13% хворих на гепатоцелюлярний рак, у 69,87% випадків експресія цього маркера була негативною. Групи СК20-імунопозитивних клітин визначалися в гістологічних зрізах ГЦР у вигляді осередкових скупчень, за даними фотоцифрової морфометрії СК20-імунопозитивні клітини займали $29,35 \pm 17,31\%$ СПГЗ гепатоцелюлярного раку. Високий рівень експресії СК20 клітинами ГЦР виявлений у 19,74% хворих, помірний рівень експресії визначений у 4,93% хворих, низький рівень експресії СК20 клітинами ГЦР був виявлений у 5,46% хворих.

За даними літератури виявилось, що ГЦР у багатьох випадках СК7 і СК20 позитивний, а також може проявляти СК19-позитивні біліарні властивості [248]. Вважається, що цитокератини СК7 і СК19 є маркерами біліарного епітелію і холангіокарциноми [267]. Тим не менш, в ГЦР експресія СК7 виявлена в 75,0% випадків, СК19 - в 22,1% випадків [145], при

цьому звертається увага на те, що цитокератин 7 і 19 позитивними є тільки низькодиференційовані і скірозні ГЦР, а також фіброламельярні карциноми [118].

Кореляційний аналіз показав, що між рівнем експресії в гепатоцелюлярному раку AFP і CK7, AFP і CK20 спостерігається пряма середньої сили кореляція (коефіцієнт Пірсона $r = +0,5$), а між рівнем експресії HerPar-1 і CK7, HerPar-1 і CK20 спостерігається прямий сильний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +1$), що найбільш ймовірно відображає потенційні можливості ракових клітин до гепатоцитарного та біліарного диференціювання.

Виконані нами імуногістохімічні дослідження показали, що в клітинах ГЦР не визначається експресія ЕМА (MUC1), відсутня експресія муцину MUC5AC, транскрипційного фактору CDX2 і онкопротеїна CA125. В ендотелії судин і синусоїдів ГЦР визначається експресія CD31 антигену, а в ендотелії атипових синусоїдів визначається експресія CD34. Відомо, що в печінці людини CD34-позитивними є синусоїдальні ендотеліальні клітини тільки в перипортальних зонах [215]. В гепатоцелюлярному раку CD34-позитивний синусоїдальний ендотелій виявляється у 100% [95] або у 42,6% [160] пухлин. Наші дослідження показали, що виявлення CD34-позитивного синусоїдального ендотелію допомагає визначити наявність та контури атипових синусоїдів в солідноклітинному патерні ГЦ раку.

Враховуючи на те, що в трепанобіоптатах ГЦР у 17,8% хворих визначався фіброзний, циротичний і скірозний ГЦР, а у 13,7% пацієнтів ГЦР виявлявся на тлі цирозу печінки, значна увага була приділена особливостям цих пухлин. Встановлено, що у фіброзному варіанті ГЦР поміж скупченнями або рядами пухлинних клітин, які оточені ледь помітними, сплющеними пухлинними синусоїдами з наявністю малочисельних ендотеліальних клітин, виявляються значні прошарки фіброзу різної конфігурації, товщини і довжини, які, найбільш ймовірно являють собою фіброзну струму ГЦР.

Циротичний ГЦР відрізняється надмірним розвитком в пухлині фіброзної строми, яка переважає над раковими клітинами. За мікроскопічною будовою в трепанобіоптатах пухлини розрізняються два варіанта циротичного гепатоцелюлярного раку. При одному з них в пухлині виявляються неправильної форми гнізді скупчення атипових пухлинних гепатоцитів, які оточені надмірно розвинутими прошарками сполучної тканини різної конфігурації і протяжності з наявністю в них різної кількості колагенових волокон та лімфоцитів. При другому варіанті циротичного гепатоцелюлярного раку пухлинні клітини формують рясні ацинарні і трабекулярні структури у вигляді неправильної форми острівців, між якими визначаються надто широкі прошарки сполучної тканини різної геометричної конфігурації з наявністю в них різної кількості фіброblastів та колагенових волокон.

В скірозному варіанті ГЦР розвиток сполучнотканинної строми в десятки разів перевищує мінімальну кількість пухлинних атипових гепатоцитів, які утворюють одно-двохклітинні ланцюги в середини синусоїдів, вистелених малочисельним сплосченим ендотелієм. При ІГХ дослідженні, на відмінність від скірозного варіанту холангіоцелюлярного раку, в пухлинних атипових гепатоцитах ГЦР виявляється слабка експресія гепатоцитарного маркера HerPar-1, а в ледь помітних синусоїдах навколо них виявляються CD31 і CD34 позитивні ендотеліальні клітини.

Встановлено, що фіброзно-циротичний і скірозний варіанти ГЦР не пов'язані з цирозом печінки, на тлі якого, частіше за все, виникає вузловий ГЦР з наявністю трабекулярних, солідноклітинних і ацинарних патернів. За нашими даними ГЦР на тлі цирозу відокремлюється значним прошарком сполучної тканини з наявністю в ній недиференційованих клітин, які формують тонкі трабекулярні і дуктулоподібні структури, що поступово трансформуються у вище зазначені патерни ракової пухлини.

Відомо, що фіброламельярна карцинома є унікальним типом раку печінки молодих людей з кращим прогнозом, ніж ГЦР [257]. Виконане нами ІГХ

дослідження фіброламельярного раку показало, що в його крупних пухлинних клітинах визначається високий рівень гранулярної цитоплазматичної експресії HerPar-1 і високий рівень цитоплазматичної експресії CK7, але водночас пухлинні клітини є AFP імунонегативними. На відмінність від інших варіантів ГЦР, в клітинах фіброламельярного раку визначається апікально-поверхнева експресія ЕМА (MUC1) та цитоплазматична експресія СК20, які вважаються маркерами біліарного диференціювання. За даними М. Torbenson [257] пухлинні клітини фіброламельлярної карциноми явно мають гепатоцелюлярні особливості, але унікальні в тому плані, що вони одночасно мають біліарне і нейроендокринне диференціювання. Великі клітини у фіброламельярній карциномі різко HerPar-1-позитивні і AFP-негативні [119], навіть у зонах з біліарним псевдозалозистим диференціюванням і продукцією муцину [119, 121]. Пухлинні клітини демонструють очікувану експресію гепатоцелюлярного цитокератину 8 і 18, а також цитокератину 7 [119, 121] та в ряді випадків (від 5 до 25%) - цитокератину 19 [119]. Нейроендокринні властивості фіброламельярної карциноми були відзначені кількома авторами, які пояснили здатністю пухлинних клітин до продукції жовчі. Більшість фіброламельярних карцином імунонегативні по відношенню до хромограніну і синаптофізину [119], проте зустрічаються пухлини, чутливі до хромограніну [120].

Комбінована гепатоцелюлярна-холангіоцелюлярна карцинома з'явилась в офіційній класифікації пухлин ВООЗ в 2010 році [255]. Sh.Jakate, D.Giusto [158] порівнюють дві класифікації комбінованого гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярного раку, в яких R.A.Allen, J.R.Lisa ще в 1949 році і Z.D.Goodman et al. в 1985 році виділили 2 типи цієї пухлини: так звану подвійну пухлину (double tumor) або колізійну пухлину (collision tumor), в якій в печінці присутні окремі сайти ГЦР і ХЦР, а також комбіновану пухлину (combined tumor) або транзиційну пухлину (transitional tumor), в якій елементи ГЦР переходять в елементи ХЦР. В наших спостереженнях вивчений один подвійний гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак, в

якому трабекулярно-солідний ГЦР був відокремлений товстою фіброзною капсулою від тубулярного ХЦР в фібропластичній стромі, і один комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак, в якому трабекулярно-солідні компоненти ГЦР поєднувалися з дуктулярно-ацинарними компонентами ХЦР в фібропластичній стромі.

Проведенні нами ІГХ дослідження комбінованого гепато-холангіоцелюлярного раку, на наше переконання свідчать про те, що він розвивається зі стовбурових клітин, а також з клітин-попередниць гепатоцитів і холангіоцитів. Тому в солідно-клітинному і трабекулярному патернах цієї пухлини виявляються пухлинні клітини з гепатоцитоподібним диференціюванням (HerPar-1-позитивні, AFP-позитивні та СК20-позитивні клітини), а в дуктулоподібному патерні цієї комбінованої пухлини визначаються СК7 і СК19-позитивні клітини, що свідчить про їх холангіоцито-біліарне диференціювання. Комбінована гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярна карцинома сьогодні розглядається як рідкісний (менше 1%) первинний рак печінки зі змішаним гепатоцитарним, холангіоцитарним і проміжним (гепатоцитарно-холангіоцитарним) фенотипом, клітини якого експресують деякі гепатоцитарні та біліарні маркери, а також варіабельний цитокіновий профіль [78, 140]. У недавніх дослідженнях з виявленням стовбурових клітин [139, 224] показано, що комбінована карцинома, можливо, є результатом трансформації печінкових стовбурових/прогеніторних клітин в бі-фенотипову пухлину з наявністю дифузно-гепатоцитарного і дуктулярно-біліарного компартментів.

Холангіоцелюлярний рак, описаний в 1959 році [240], залишається найменш вивченим первинним раком печінки. Згідно з сучасними класифікаціями Міжнародного протиракового союзу (International Union Against Cancer - UICC) 2009 року та японської групи по вивченню раку печінки (Liver Cancer Study Group of Japan - LSCGJ) 2013 року [218, 220] вивчений нами ХЦР за локалізацією первинного росту пухлини є

внутрішньопечінковим (периферійним), за типом макроскопічного росту він являє собою так званий мас-формуєчий ХЦР.

Виконані нами гістологічні, гістохімічні і імуногістохімічні дослідження показали, що в трепанобіоптатах печінки внутрішньопечінковий (периферійний) мас-формуєчий ХЦР характеризується наявністю трьох основних мікроскопічних патернів (тубулярного, ацинарного та солідно-клітинного), а також значною десмопластичною строєю. Це збігається з сучасними уявленнями про те, що внутрішньопечінковий/периферійний ХЦР являє собою рак із залозистими і тубулярними структурами, який відрізняється розвиненою десмопластичною строєю [244], а також проліферацією асоційованих з пухлиною α -SMA-позитивних стромальних клітин і фібробластів, які генерують десмопластичну строю пухлин [71]. Стромальні клітини ХЦР характеризуються виментин + / α -SMA + і CK7- / CK19- фенотипом [157].

За нашими даними, в тубулярному патерні ХЦР розташовані або гілкуваті дуктулярні структури з вузькими просвітами, вистелені кубоїдальним та сплосченим епітелієм, або тубулярні структури з наявними просвітами, вистеленими кубоїдальними клітинами з еозинофільною цитоплазмою, округлими ядрами і майже непомітним ядерцем. В залозисто-ацинарному патерні ХЦР визначаються округлі залозистоподібні структури або розгалуджені ацинарні структури, сформовані стовпчастим, високопризматичним або циліндричним пухлинним епітелієм з гіперхромними овально-протяжними ядрами без помітних ядерць. Залозистоподібні і ацинарні структури вистелені багаторядним, двох-трьохрядним, або переважно однорядним стовпчастим пухлинним епітелієм. В деяких крупних ацинарних мікроструктурах визначаються кріброзні утворення та папілярні вирости з пухлинних клітин. Солідно-клітинний патерн ХЦР являє собою поширені ділянки тісно прилеглих одна до одної кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних клітин з гіперхромними ядрами, оточеними вузьким обідком цитоплазми, а гніздно-клітинний патерн

утворюють скупчення кубоїдальних, округло-овальних, циліндричних пухлинних клітин з гіперхромними ядрами без помітних ядерців.

Виявлена нами структурна неоднорідність ХЦР відповідає результатам, отриманим іншими авторами в останні роки. С. Sempoux зі співавторами [229] виділяє класичну внутрішньопечінкову холангіокарциному з тубулярним, залозистим або гніздовим (солідно клітинним) патернами росту; некласичну внутрішньопечінкову холангіокарциному з трабекулярною архітектурою, а також карциноми, що походять з печінкових прогеніторних клітин (комбіновані гепатоцелюлярні/холангіоцелюлярні карциноми і внутрішньопечінкові холангіоцелюлярні карциноми дуктулярного типу). S. Rizvi, G.J. Gores [224] вважають, що джерелом внутрішньопечінкової холангіоцелюлярної карциноми можуть бути печінкові прогеніторні клітини, а також прогеніторні клітини холангіоцитів, а M. Komuta зі співавторами [167] вважають, що її джерелом є топографічно різноманітні холангіоцити: циліндричні муцин-продукуючі холангіоцити, які локалізовані у великих жовчовивідних протоках, і кубоїдальні муцин-негативні холангіоцити, локалізовані в холангіолах, що містять біпотенційні печінкові прогеніторні клітини. J-Y Liau зі співавторами [192] в 2014 році також виділили 2 субтипи внутрішньопечінкової холангіокарциноми: жовчно-протоковий, в якому переважає крупно-залозистий патерн з високого стовпчастого пухлинного епітелію, і холангіолярний, в якому переважають дуктули з кубоїдальних і низьких стовпчастих пухлинних клітин.

Складність морфогенезу, мікроскопічної структури і імунофенотипу ХЦР печінки продемонстрували V.Cardinale зі співавторами [71] на підставі молекулярно-імуногістохімічного аналізу клітин, з яких походить холангіокарцинома. Вони виділили 2 лінії клітин-попередниць і різні різновиди холангіокарцином за їх клітинним походженням:

- Холангіокарциноми, що походять із локалізованих в каналцях Герінга стовбурових печінкових клітин, представляють собою комбінований гепатоцелюлярно-холангіоцелюлярний рак, змішану холангіокарциному з

фокальними ділянками гепататоцитарного диференціювання і холангіокарциному дуктулярного типу.

- Чисті MUC-продукуючі холангіокарциноми (перихіларна пухлина Клатскіна та мис-позитивна внутрішньопечінкова холангіокарцинома), що походять з стовбурових/прогеніторних клітин, локалізованих в перибіліарних залозах внутрішньопечінкового або поза печінкового біліарного дерева, які в нормі формують епітелій внутрішньопечінкових і позапечінкових жовчних проток.

Виконані нами дослідження поглибили представлення про ступені гістологічного диференціювання внутрішньопечінкового ХЦР, засновані на порівнянні пухлинних і здорових клітин в градаціях Міжнародного протиракового союзу (UICC) 2009 року [236] і Американського об'єднаного комітету раку (AJCC) 2009 року [51]. Нами встановлено, що у помірно диференційованому G2 холагіоцелюлярному раку залозистоподібні і ацинарні структури вистелені переважно одно-двохрядним високопризматичним або циліндричним пухлинним епітелієм, вони зближені між собою і розділені вузькими сполучнотканинними прошарками, інвазія пухлинного епітелію в фібропластичну строму відсутня. У низько диференційованому G3 холангіоцелюлярному раку залозистоподібні і ацинарні структури вистелені багаторядним поліморфним високопризматичним і циліндричним пухлинним епітелієм, який утворює пухлинні мікропапілярні і криброзні структури; ацинарні і залозистоподібні структури зближені між собою, визначаються вогнища інвазії пухлинного епітелію через базальні мембрани в фібропластичну строму. Низькому ступеню диференціювання ХЦР притаманні солідно-клітинний і гніздно-клітинний патерни, до нього також відноситься скірозний варіант пухлини.

У низькодиференційованому ХЦР в трепанобіоптатах печінки поряд солідно-клітинними і гніздно-клітинними скупченнями в фібропластичній стромі спостерігаються рідкі, поодинокі дуктулоподібні структури, а в фібропластичній стромі можуть виявлятися поодинокі муцин-продукуючі

клітини або дрібні вогнища муциноподібного ослизнення стромы. У низькодиференційованому ХЦР в пухлинних клітинах визначається різної інтенсивності цитоплазматична експресія СА 19-9 , а в залозисто-ацинарному патерні ХЦР виявляється мембранно-цитоплазматична експресія муцинів MUC1 і MUC5AC.

Виконані нами ІГХ дослідження продемонстрували, що для холангіоцелюлярного раку печінки характерним є імунотип HepPar 1 - | AFP +/- | CK7 + | CK8 +/- | CK19 + | CK20 +/- | CA125 + | CA19-9 + | CDX2 +/- | MUC1 + | MUC5AC +. При ІГХ аналізі позитивної експресії HepPar-1 клітинами ХЦР печінки нами не виявлено, що відповідає даним інших дослідників. На думку S.A.Geller et al. [123] і A. Lugli et al. [138] все холангіокарциноми є HepPar-1-імунонегативними. Аналізуючи дані імуногістохімічної експресії диференційно-діагностичних маркерів (HepPar-1, AFP, CK7, 8, 18, 19 и 20) нами встановлено що, у 47,22% хворих на ХЦР в злоякісних клітинах визначалася цитоплазматична і ядерна експресія α -фетопротейну. Встановлено, що рівень експресії AFP пухлинними клітинами і площа AFP-імунопозитивних клітин в ХЦР нижче, ніж в ГЦР печінки. За даними S.A. Geller et al. [123] AFP-імунопозитивними є не більше 10% ХЦР печінки; більшість патологів зазначає, що AFP є маркером гепатоцелюлярного диференціювання злоякісних клітин печінки, однак чутливість цього маркера в ГЦР, за даними різних авторів, становить від 15% до 70% [31, 123].

Проведені нами ІГХ дослідження показали, що у 97,22% хворих на ХЦР печінки в пухлинних клітинах визначається цитоплазматична експресія CK7, у 45,29% пацієнтів має місце цитоплазматична експресія CK20 клітинами ХЦР. При паралельному імуногістохімічному дослідженні експресії CK7 клітинами ГЦР нами було встановлено, що вона була позитивною в 37,74% випадків, що значно менше ніж в ХЦР. Слабо позитивну і осередкову експресію CK7 в ГЦР також виявляли і інші патологи [54, 248]. Нами встановлено, що площа, яку займали CK7-імунопозитивні клітини в ХЦР

практично в 2 рази більша ніж площа, яку займали СК7-імунопозитивні клітини в ГЦР. Виявлений нами поліморфізм експресії диференційно-діагностичних ІГХ маркерів в ГЦР і ХЦР, на наше переконання, свідчить про те, що при розвитку первинного раку печінки зі стовбурових клітин або клітин-попередниць в ГЦР і ХЦР з'являється різна «домішка» пухлинних клітин з гепатоцитоподобним і холангіоцитоподібним типом диференціювання.

Імуногістохімічні дослідження ГЦР і ХЦР підтвердили, що важливу роль в канцерогенезі первинного раку печінки відіграє вірус гепатиту В. За даними проведених нами імуногістохімічних досліджень було встановлено, що у 100% хворих на ГЦР та у 72,97% хворих на ХЦР в пухлинних клітинах виявляється дифузно-гранулярна цитоплазматична та ядерна експресія HbsAg різної інтенсивності. У 82,0% хворих на ГЦР і у 43,25% хворих на ХЦР в цитоплазмі пухлинних клітин виявлена різної інтенсивності експресія HbsAg. Ці данні підтверджуються і іншими дослідниками, які також вважають, що віруси гепатиту В и С є одним з етіологічних факторів розвитку ГЦ та ХЦ раку печінки [117, 153, 180, 222, 223]. Епідеміологічні дослідження показали, що ризик розвитку раку печінки у хворих гепатотропною вірусною інфекцією в 20 разів вище, ніж у решти населення [5]. Згідно Е.Б.Ярошенко і співавт. [47] в 75-80% випадків ГЦР має вірусний генез, причому 50-55% припадає на частку HBV інфекції, а 25-30% - на частку гепатотропної С-вірусної (HCV) інфекції. Про вірусний гепатокарциногенез також свідчить висока частота виявлення вірусних антигенів у хворих первинним раком печінки: в Північній Америці HbsAg виявляється в крові у 52% хворих на ГЦР, в Румунії - у 24% хворих ГЦР печінки. Про це також свідчить висока частота гепатоцелюлярного раку, асоційованого з цирозом печінки, який діагностують у 30—80% хворих [195, 203]. Зокрема, ГЦР на фоні цирозу печінки, обумовленому хронічним вірусним гепатитом В, С, В+С, В+D, спостерігається у 33% хворих [9]. За даними двох італійських досліджень [68, 89] 30% внутрішньопечінкових

мас-формуючих ХЦР асоційовані з вірусним гепатитом (HBV, HCV), у 14% пацієнтів був виявлений цироз печінки.

На сьогодні актуальною є розробка для трепанобіоптатів патогістологічних та імуногістохімічних параметрів для диференційної діагностики ГЦР, ХЦР та метастатичного раку печінки, особливо зі схожою гістологічною картиною. Тому для вирішення цього питання нами проведено порівняльне патоморфологічне дослідження біоптатів печінки з наявністю солідно-клітинних пухлин або пухлин гніздно-клітинної мікроструктури (ГЦР, меланоми, нейроендокринні пухлини), пухлин тубулярної мікроструктури з фібропластичною строюю (ХЦР, протоковий рак підшлункової залози) і без фібропластичної строми (рак молочної залози, нирки, передміхурової залози), а також пухлин з залозистою структурою та з розвиненою строюю (ХЦР, аденокарцинома, колоректальний рак).

Проведені нами дослідження показали, що при диференційній діагностиці ГЦР і метастатичних уражень печінки слід враховувати, що виділені N. Shafizadeh, S. Kakar [231] класичні гістоморфологічні особливості ГЦР (добре виражена васкуляризація пухлини, широкі трабекули з більш ніж 3-х клітин, виражений ацинарний патерн, наявність дрібних клітин з цитологічною атипією, наявність мітозів, судинна інвазія, відсутність клітин Купфера і втрата ретикулінової мережі) повною мірою не визначаються в пункційних трепанобіоптатах печінки з обмеженим обсягом пухлинної тканини. Тому важливе діагностичне значення набувають додаткові ІГХ дослідження. Без них практично неможливо розпізнати гепато- або холангіоцелюлярний фенотип солідноклітинного і низькодиференційованого раку, неможлива диференційна діагностика в тих випадках, коли в трепанобіоптат не потрапляють характерні патерни ГЦР або тубулярний патерн ХЦР. Найбільш складною є диференційна патоморфологічна діагностика в трепанобіоптатах печінки фіброзно-циротичного варіанта ГЦК, ХЦР і метастазів протокового раку підшлункової залози (ПЗ), а також

диференційна патоморфологічна діагностика солідноклітинних варіантів ГЦР, ХЦР і метастазів у печінку пухлин не уточненої первинної локалізації.

Нами та іншими авторами [118, 145] показано, що найбільш надійним ІГХ маркером ГЦР є HerPar-1, цитоплазматична гранулярна експресія якого в пухлинних клітинах визначається у 80-92-100% хворих. В останні роки невисокий рівень експресії HerPar-1 також виявлений в клітинах раку легені, підшлункової залози, шлунка, стравоходу, жовчного міхура, тонкої кишки, наднирників, сечового міхура, в меланомі і парагангліоми [138]. Тому при диференційній діагностиці рекомендується враховувати, що високий рівень цитоплазматичної гранулярної експресії HerPar-1 характерний для клітин ГЦР, в той час як в негепатоцитарних тканинах рівень експресії HerPar-1 більш слабкий і не завжди гранулярний [118,166]. Враховуючи дані Ferrel L.L., Kakar S. (2013) [118] про те, що експресія HerPar-1 відсутня в 80-90% низькодиференційованих ГЦР, а також те, що відсоток α -ФТР-позитивних клітин зростає в міру зниження диференціювання ГЦР [146] доцільно в диференційно-діагностичну панель паралельно включати визначення α -ФТР, експресія якого за нашими даними спостерігається в клітинах ГЦР у 81,13% хворих. При остаточній оцінці результатів ІГХ слід враховувати низьку (близько 30%) чутливість α -ФТР в ГЦР [251]. Про відсутність значущих відмінностей в експресії альфа-фетопротейну в ГЦР і ХЦР повідомляють також інші автори [23,123], які встановили, що АФР-імунопозитивними є 15% -65% -70% гепатоцелюлярних карцином, а АФР-негативними є тільки 90% холангіокарцином. Міжнародна консенсусна група по гепатоцелюлярним неоплазіям [251] в 2009 році звернула увагу на низьку (близько 30%) чутливість клітин ГЦР до альфа-фетопротейну, а відомості про те, що альфа-фетопротейн також позитивний в 97% дрібних метастатичних аденокарциномах і в частині холангіокарцином [166] підтверджують низьку диференційно-діагностичну значимість цього маркера. Рівень диференційної діагностики ГЦР і метастазів у печінку інших карцином підвищує паралельне застосування HerPar-1, аргінази-3 і гліпікана-3, так як гліпікан-3 виявляється

в 89% низькодиференційованих ГЦР [193]. В останні роки повідомляється, що мітохондрії зрілих гепатоцитів і клітин ГЦР є не тільки HerPar-1-позитивними, але в ГЦР також виявляється гранулярна цитоплазматична експресія TTF-1 (антитіл до транскрипційного тиреоїдного фактору 1) [62, 160, 213].

Аналіз літературних даних показує, що визначення експресії найбільш часто вживаних муцин-асоційованих глікопротеїнів (MUC-1, MUC3, MUC4, MUC5AC і MOC-31) і деяких онкопротеїнів (CA19-9 і CA125) не дає значущої інформації для диференційної діагностики ХЦР і метастазів в печінку протокової карциноми ПЗ. У холангіокарциномах експресія MUC1, MUC2, MUC5AC і MUC6 виявлена у 65,8, 23,5, 61,1 і 14,1% пацієнтів [106]. Клітини протокової аденокарциноми ПЗ позитивні до MUC-1, MUC3, MUC4 і MUC5AC, а також до онкопротеїнів CA19-9 і CA125, кожен з яких не специфічний для цього типу пухлини [53].

CA 19-9 виявляється у 85% внутрішньопечінкових холангіокарцином [118], а також у 86% аденокарцином ПЗ. Цей антиген вважається маркером карцином ПЗ, хоча він також визначається в інших злоякісних гастроінтестинальних пухлинах [181]. Муциноподібний глікопротеїн CA125 (або MUC16) виявляється в 81,5% панкреатичних протокових карцином [194] і вважається маркером аденокарциноми ПЗ [184], однак його експресія також визначається в 20-48% внутрішньопечінкових холангіокарцином [208].

Експресія кишково-специфічного транскрипційного фактора CDX2 визначається не тільки в раку шлунка і кишечника, але також у внутрішньопечінкових холангіокарциномах [64, 249], в клітинах протокової карциноми ПЗ [53,64, 249] і в метастазах в печінку пухлин ПЗ [4].

Слід зазначити, що значно вираженою α -SMA-позитивною десмопластичною стромою, окрім ХЦР, також відрізняється протокова карцинома ПЗ і її метастази в печінку [32, 91]. Тому ІГХ параметри десмопластичної стромы ХЦР і метастазів у печінку протокової карциноми ПЗ схожі й не мають значущої диференційно-діагностичної інформації.

Дані про диференційне значенні експресії цитокератинів первинними і метастатичними пухлинами печінки дуже суперечливі. Можливість диференційного визначення експресії цитокератинів ґрунтується на тому, що ГЦР і ХЦР найбільш імовірно походять з печінкових прогеніторних клітин, які локалізовані в каналцях Герінга і в нормі диференціюються в гепатоцити і холангіоцити [151, 244]. Тому клітинам ГЦР (як і нормальним гепатоцитам) притаманна експресія цитокератинів 8 і 18, а клітинам ХЦР (як і холангіоцитам) притаманна експресія цитокератинів 7 і 19 [244]. У наших дослідженнях в ХЦР експресія СК7 пухлинними клітинами виявлена у 97,22% хворих, а експресія СК20 - у 45,29% хворих; в той же час в ГЦР експресія СК7 пухлинними клітинами виявлена у 37,74% хворих, а експресія СК20 - у 30,13% хворих. Приблизно таку ж частоту експресії в ГЦР цих цитокератинів (експресію СК7 - у 29,4% хворих, експресію СК20 - у 14,7% пацієнтів) виявляють і інші автори [160]. Отримані нами дані з нерівнозначної експресії СК7 і СК20 в ХЦР і ГЦР підкреслюють складний гістогенез цих пухлин та можливість домішки в них клітин, похідних різних попередників. Незважаючи на це, в діагностичних посібниках останніх років постулюється, що зазвичай ГЦР СК20 негативний, а метастатичні аденокарциноми СК7/19 і 20 позитивні [118].

Метастази меланому складають орієнтовно 2,2% всіх метастатичних уражень печінки [261]. Виконані нами ІГХ дослідження показали, що в печінкових метастазах меланому визначається експресія S-100, CD56, меланосомального глікопротеїну HMB45 і тирозинази, що бере участь у синтезі меланіну. В клітинах метастазів меланому не визначається експресія маркерів ГЦР, таких як HerPar-1 і α -FTR. Це повністю збігається з даними інших авторів [43, 53, 118], що вказують на експресію в метастазах меланому S-100, Mart-1 (melan A) і тирозинази, а також відсутність експресії цитокератинів, HerPar-1, α - FTR, поліклонального карциноембріонального антигену (pCEA). Деякими дослідниками [213] відзначається, що приблизно в 3% метастазів меланому в печінці визначається експресія AE1/AE3

цитокератинів. Для оптимізації діагностики всіх видів меланом та її метастазів пропонується застосування суміші антитіл до меланоми (HMB45, MART-1 / Мелан А і тирозинази) [204].

Результати проведених нами ІГХ досліджень показали, що в метастазах в печінку раку молочної залози визначається експресія СК7, рецепторів естрогенів, маммаглобіна, у клітинах метастазів відсутня експресія СК20, гепатоцитарних, меланоцитарних та нейроендокринних маркерів. Це збігається з даними інших авторів [53, 118, 190, 213], деякі з яких підкреслили високу специфічність експресії естрогенових рецепторів і низьку чутливість експресії прогестеронових рецепторів в метастазах раку молочної залози в печінку [199], а також те, що коекспресія СК7 і СК20 відзначається тільки в печінкових метастазах папілярного і муцинозного раку молочної залози [190].

У клітинах метастазів нейроендокринних пухлин нами виявлялася експресія хромограніна, синаптофізіна і CD56 (рідко - S-100), в них відсутня експресія цитокератинів 7 і 20, рецепторів естрогену і андрогенів, гепатоцитарних і меланоцитарних маркерів. На аналогічні ІГХ ознаки метастазів нейроендокринних пухлин вказують і інші патологи [53, 118], відзначаючи, що в залежності від первинної локалізації нейроендокринної пухлини в її метастазах в деяких випадках спостерігається експресія СК АЕ1 / АЕ3 [213] або СК7 [118].

Метастази раку передміхурової залози в печінці відрізнялися експресією рецепторів андрогенів і простатспецифічного антигену, в них не визначалася експресія цитокератинів 7 і 20, а також гепатоцитарних, меланоцитарних та нейроендокринних маркерів. Це співпадає з даними інших патологів [53, 66, 118], що рекомендують додатково досліджувати експресію простатичної кислоти фосфатази (РАР).

Проведені нами дослідження показали, що метастази в печінку аденокарциноми шлунка та колоректального раку тубулярної і залозисто-ацинарної структури мають подібний імуногістохімічний профіль експресії

CK20, CDX2, CA 19-9 і муцинів CA 125, MUC2 і MUC5AC, диференційне значення має відсутність експресії CK7 в метастазах колоректального раку і її наявність в метастазах аденокарциноми шлунка. В пухлинних клітинах метастазів аденокарциноми шлунка не має експресії TTF-1 і гепатоцитарних маркерів HerPar-1 та α -FTP. Аналогічні результати по коекспресії цитокератинів і негативній реакції з HerPar-1 і TTF-1 в метастазах раку шлунка відзначені іншими патологами [118], а дані по коекспресії в метастазах раку шлунка муцинов, CDX2 і CK20 описані JL Dennis з співавт. [184], по експресії CA19-9 - Makoto Osanai [181] і A.S. Sawan [225].

На те, що профіль CK7- / CK20 + / CDX2 + характерний для колоректального раку, а профіль CK + / CK20 + / CDX2 + характерний для аденокарциноми шлунка звертають також увагу інші патологи [23, 53, 184, 190].

Наші дослідження підтвердили дані В.А. Centeno і RT Miller [66, 190] про те, що в клітинах метастазів у печінку нирковоклітинного раку зазвичай не визначається експресії CK7 і CK20. Однак для діагностики таких метастазів необхідно застосовувати більш характерні маркери нирковоклітинної карциноми (RCC) і транскрипційний фактор PAX-2 [43,59,118], а також використовувати дані комп'ютерної томографії, яка підтверджує наявність пухлини нирки.

Нечисленні спостереження метастазів раку легені в печінку збіглися з даними інших авторів про те, що метастази цього раку є TTF-1 і CK7 імунопозитивними, пухлинні клітини метастазів не експресують CK20, CDX2 і CA125 [53, 184, 190].

Проведені нами ІГХ дослідження виявили значну складність диференційної патоморфологічної діагностики в трепанобіоптатах печінки фіброзно-циротичного варіанта ГЦР, ХЦР і метастазів протокового раку ПЖ, які відрізняються вираженою фіброзною строюю. За даними В. McKenna, Sh. Bihlmeier [186] циротичний ГЦР становить від 0,2 до 4,6% усіх випадків такого раку. Відомо, що ГЦР є муцин (МОС-31)-негативною пухлиною [160],

а HerPac-1, що має 100% чутливість і 92% специфічність [12], вважається найбільш адекватним ІГХ маркером цього раку. Інші патологи також виявили цитоплазматичну гранулярну експресію HerPac-1 в 80-90% [20] і в 95.6% гепатоцелюлярних карцином [160], при відсутності експресії цього маркера в холангіокарциномі. Тим не менш, іншими дослідниками [138, 217] встановлено, що низький рівень експресії HerPac-1 можуть мати 16,7% холангіокарцином, близько 15% інших пухлин (шлункові, легеневі, тонкокишечні, товстокишкові і панкреатичні аденокарциноми, меланоми), а також їхні метастази в печінку. Тому при диференційній діагностиці ГЦР, холангіокарциноми і метастатичного раку шлунково-кишкового тракту рекомендується звертати увагу на слабкий рівень експресії HerPac-1 в негепатоцитарних тканинах і на високий рівень гранулярної цитоплазматичної експресії HerPac-1 у клітинах ГЦР [166]. Разом з тим, в останні роки встановлено, що експресія HerPac-1 не виявляється в 80-90% низькодиференційованих гепатоцелюлярних карцином [118] і в скірозних варіантах ГЦР [144]. У таких випадках рівень диференційної діагностики ГЦР від метастатичних карцином підвищує паралельне застосування аргінази-3, HerPac-1 і гліпікана-3, так як гліпікан-3 має більш високу 86% специфічність і 75% чутливість для ГЦР, а також виявляється в 89% низькодиференційованих гепатоцелюлярних карцином [193].

За нашими даними, для диференційної діагностики в трепанобіоптатах печінки фіброзно-циротичних варіантів ГЦР, солідноклітинного і тубулярного ХЦР, а також метастазів у печінку протокової карциноми ПЗ малоінформативними є варіабельні характеристики цитокератинового профілю цих пухлин. Відомо, що маркерами ХЦР був визнаний СК19, що має в цій пухлині 83% чутливість і 78% специфічність [12], і СК7, що виявляється в 90-96% цих пухлин [53], а патогномонічними маркерами ГЦР визнані СК8 і СК18. ГЦР віднесений до СК20 і СК19 негативних пухлин тому, що слабка і вогнищева експресія СК20 виявляється всього в 10-30% гепатоцелюлярних карцином [268], а вогнищева експресія СК19 - в 10% цих

пухлин [81]. Такий цитокератиновий профіль ХЦР (СК7 + / СК19 + / СК20 +) і ГЦР (СК8 + / СК18 +) підтвердили С.А. Гусарєв [10] і Р.В. Іщенко [23], в той час як інші дослідники наводять інші результати. У ГЦР експресія СК7 визначалася в 29,4% -31,3% випадків [79, 160], експресія СК19 - в 10.1% [79], а експресія СК20 виявлена в 14.7% випадків [160]. У ХЦР рівень експресії СК7 і СК19 становив 83,4% і 89,0% [79]. У 2006-2015 роках встановлено, що близько 28% ГЦР містять СК19 + і СК7 + клітини біліарного типу; на думку авторів [64, 248] це свідчить про походження таких пухлин з прогеніторних клітин печінки. За даними А. Durnez et al. [248] 72% ГЦР були СК7 і СК19 негативними, 12% мали СК7 + / СК19- профіль, 6% - мали СК7- / СК19 + профіль і 10% були СК7 і СК19 позитивними. Імунопозитивними по СК7 і СК19 є низькодиференційований ГЦР, скірозний ГЦР і фіброламельярні пухлини [118]. Результати ІГХ досліджень показали більш високу експресію цитокератину 7 і значно нижчу експресію Нер Par-1 в скірозному ГЦР в порівнянні з традиційним ГЦР [226]. За даними Т. Sugiki et al. [238] скірозний ГЦР в 43% випадків Нер Par-1 негативний.

Як відомо, важливим механізмом прогресування злоякісних пухлин є посилення проліферації пухлинних клітин і їх ухилення від апоптозу [130, 131]. Нами, за результатами імуногістохімічного дослідження маркерів апоптозу (p53, каспаза-3) та проліферації (Ki-67), було встановлено, що у ГЦР і ХЦР переважала гіперекспресія ядерного білка p53, низький рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 і помірний рівень ядерної експресії Ki-67. Нами встановлено, що середній рівень експресії Ki-67 в ГЦР склав $2,77 \pm 0,92$ бала, в ХЦР - $2,46 \pm 1,09$ бала.

Літературні дані про проліферативну та апоптотичну активність клітин ХЦР нечисленні і суперечливі. На думку різних авторів експресія p53 імуногістохімічно визначається в 20-80% випадків ХЦР [123, 196, 270]. X Wang Zhang J et al. [270] позитивну експресію Ki-67 і p53 виявили в 96,7% і 53,3% зразків ХЦР, відповідно. Відомо, що в нормі ген p-53 реагує на появу в клітині, що ділиться, мутантної ДНК зупинкою клітинного циклу і

стимуляцією апоптозу, а білок p53, що їм кодується, має короткий період напіврозпаду і тому імуногістохімічними методами не виявляється в здоровій тканині. При мутації гена p-53 в ядрах пухлинних клітин накопичується неактивний, мутантний протеїн p53, який визначається імуногістохімічними методами [1], при цьому гіперекспресія протеїну p53 свідчить про високий ступінь інактивації онкосупресорного гена p-53 [84]. У зв'язку з мутацією і інактивацією гена p-53 падає своєчасна апоптотична елімінація пухлинних клітин з мутантною ДНК, знижується рівень їх апоптозу, припиняється нормальне фенотипове диференціювання нових клітинних поколінь, наростає неконтрольована проліферація пухлинних клітин з дефектною ДНК і прогресування холангіоцелюлярного раку [196, 252]. За результатами молекулярно-генетичних досліджень мутація гена p53 виявляється в 28-61% ХЦР [84, 196]. А. Tannapfel et al. [196] виявили мутацію гена p53 в ХЦР у 37% хворих, при цьому позитивна експресія білка p53 була встановлена у 93,33% хворих з мутацією гена p53 в пухлині. Згідно S.A. Geller et al. [123] експресія p53 визначається більш ніж в 60% ХЦР. Xiao-Fang Liu et al. [84] позитивну експресію p53 встановили в 52,8% випадків ХЦР печінки. Деякі автори вказують на зв'язок між гіперекспресією протеїну p53 в ХЦР, поганим його прогнозом і зменшенням виживаності хворих [206, 219], в той час як інші автори не знаходять такого взаємозв'язку [48, 189] або підкреслюють незалежну прогностичну значимість експресії p53 в позапечінковій холангіокарциномі [94].

Сучасні відомості про рівні апоптозу та проліферативної активності клітин в ГЦР також суперечливі. J. Koskinas зі співавторами [133] показали, що в пухлинній тканині експресія Ki-67 вище, ніж у навколишній тканині печінки, і індекс клітинної проліферації зростає зі збільшенням ступеня злоякісності пухлини. Cezar Stroescu et al. [107] позитивну експресію p53 спостерігали в 68% випадків ГЦР, позитивну експресію Ki-67 і PCNA встановили в однаковій кількості випадків - 63.8%. A. Saftoiu et al. [143] виявили позитивну експресію p53 в 46.88%. Elena Mocanu et al [191]

повідомляють про те, що експресія Ki-67 була негативною в 22,5% досліджуваних ними випадків ГЦР. R. Persad et al. [205] в 52% випадків ГЦК відзначали позитивну експресію каспаз-3.

Доведено, що в апоптозі пухлинних клітин ХЦР і ГЦР важливу роль грають FAS/APO рецепторний і мітохондріальний шляхи апоптозу [116]. Каспаза 3 грає ключову роль в обох шляхах апоптозу: в FAS/APO рецепторному шляху апоптозу вона активується каспазою 8, а в мітохондріальному шляху апоптозу - активується каспазою 9 [201]. Тому рівень експресії каспази-3 реально відбиває рівень апоптозу пухлинних клітин. За результатами проведених нами імуногістохімічних досліджень в ГЦР і ХЦР переважав низький рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 пухлинними клітинами, виявлений в 47,28% і 48,72% випадків, відповідно. Високий рівень експресії каспаз-3 був встановлений у 27,27% хворих на ГЦР і у 28,2% хворих на ХЦР печінки. У 25,45% пацієнтів з ГЦР і у 23,08% хворих на ХЦР визначався помірний рівень експресії каспази-3. Каспаза-3 імунопозитивні клітини в середньому займали $49,22 \pm 19,76\%$ СПГЗ ГЦР і $45,74 \pm 20,15\%$ СПГЗ ХЦР печінки. У той же час у пацієнтів, у яких відзначалася гіперекспресія p53, рівень експресії каспази-3 був слабким або помірним. За даними XU Peng et al. [109] експресія каспази-3 в холангіокарциномі знижується у міру зниження диференціювання пухлини і появи лімфогенних метастазів. Зниження рівня експресії каспази-3 в менш диференційованих холангіокарциномах також виявили WU Ying - ying et al. [108].

Відомо, що ключову роль у швидкому зростанні інвазії і метастазування холангіо- і гепатоцелюлярного раку печінки відіграють металопротеїнази [50, 103, 147]. Згідно літературних даних експресія MMP та TIMP-1 відмічається і в ГЦР, і в ХЦР печінки [49, 110]. Враховуючи фізіологічні функції MMP, експресію цих ферментів в пухлині асоціювали з інвазивним ростом пухлинних клітин в навколишню тканину, з їх проникненням в

судини, а також із метастазуванням ГЦР [52, 147, 187] і ХЦР печінки [102, 103].

Наші дослідження показали, що у 92,73% хворих ГЦР печінки і у 89,74% хворих ХЦР печінки в злоякісних клітинах визначалася цитоплазматична експресія MMP-9. MMP-9 імунопозитивні клітини становили $59,33 \pm 22,57\%$ СПГЗ ГЦР і $52,71 \pm 20,86\%$ СПГЗ ХЦР печінки. У 80% хворих в ГЦР та у 74,36% хворих в ХЦР в пухлинних клітинах виявлений, в основному, низький рівень цитоплазматичної експресії TIMP-1. TIMP-1 імунопозитивні клітини займали меншу площу, ніж MMP-9-позитивні клітини: TIMP-1-позитивні клітини склали $21,94 \pm 6,27\%$ СПГЗ ГЦР печінки і $33,05 \pm 13,85\%$ СПГЗ ХЦР печінки. 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 $r = -0,67$ і $r = -0,85$ відповідно), що свідчить про високий інвазивний потенціал цих пухлин.

Частота позитивної експресії MMP-9 в ХЦР, виявлена іншими дослідниками, широко варіює і коливається від 43% [105] до 73% [102] і навіть до 95% [103]. За даними D. Nart et al. [113] позитивна експресія MMP-9 виявлялася в 74,2% ГЦР, при цьому низький рівень експресії цього ферменту був виявлений в 30,3% спостережень, а помірний рівень експресії MMP-9 - в 43,8% випадків. K. Itatsu et al. [104] позитивну імуногістохімічну реакцію клітин ХЦР з MMP-9 виявили у 47,5% хворих.

Серед прогностичних маркерів розвитку ГЦР і ХЦР значення мають молекули клітинної адгезії, рівень експресії яких значно змінюється в злоякісних пухлинах. Проведений нами аналіз експресії пухлинними клітинами адгезивно-міграційних маркерів показав, що клітини ГЦ і ХЦ раку печінки характеризуються втратою експресії E-кадгеріну і зростанням аномальної ядерної та цитоплазматичної експресії β -катеніну (у порівнянні з гепатоцитами і біліарним епітелієм нормальної тканини печінки).

При імуногістохімічному та морфометричному аналізі експресії адгезивно-міграційних маркерів нами було встановлено, що у 36,36% хворих на ГЦР експресія Е-кадгерину в пухлинних клітинах не визначалась. Це співпадає з даними Jiang Chen et al. [215], які спостерігали зниження експресії Е-кадгерину в 20-60% випадків ГЦР і пов'язали це з різним ступенем гістологічного диференціювання пухлини. В той же час, за нашими даними у 63,64% хворих на ГЦР і у 100% хворих на ХЦР печінки в злоякісних клітинах визначається експресія Е-кадгерину. Імунопозитивні клітини з мембранною або мембрано-цитоплазматичною експресією Е-кадгерину склали 42,25±15,12% СПГЗ гепатоцелюлярного раку і 35,13±15,69% СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки. При паралельному імуногістохімічному та морфометричному дослідженні рівня експресії β-катеніну у 94,55% хворих на гепатоцелюлярний рак печінки і у 100% хворих на холангіоцелюлярний рак печінки в пухлинних клітинах була виявлена мембрана експресія β-катеніну, яка поєднувалася з цитоплазматичною або з ядерною експресією цього білка. β-катенін-імунопозитивні клітини склали 62,39±20,41% СПГЗ гепатоцелюлярного раку печінки і 55,83±19,67% СПГЗ холангіоцелюлярного раку печінки. 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). J. Settakorn et al. [230] виявили цитоплазматичну експресію Е-кадгерину і β-катеніну в 100% спостережень ХЦР. Позитивна мембранна експресія Е-кадгерину і β-катеніну була виявлена ними в 37,8% і 41,94% спостережень відповідно, в 16,13% спостережень була встановлена ядерна експресія β-катеніну клітинами ХЦР. Згідно з результатами дослідження Chen Jiang et al. [215] і Peifeng Li et al. [111] аномальна цитоплазматична та/або ядерна експресія β-катеніну виявляється в 17-40% ГЦР, вона є незалежним прогностичним фактором, асоційованим з поганим прогнозом і збільшенням інвазивного потенціалу ГЦР. У своїх дослідженнях Liem Thanh Tien et al. [112] виявили позитивну мембранну

експресію β-катеніну, асоційовану з цитоплазматичною або з ядерною експресією в злоякісних клітинах 78% ГЦР. В добре і помірно диференційованому ГЦР експресія β-катеніну виявлялася на мембрані і в цитоплазмі клітин. За даними S.H. Bae et al. [114] ядерна експресія β-катеніну виявлялася тільки в помірно і слабо диференційованих гепатоцелюлярних карциномах.

При комплексному іммуногістохімічному та морфометричному дослідженні площі p53, каспаза-3, Ki-67, MMP-9, TIMP-1, E-кадгерин та β-катенін іммунопозитивних клітин в ГЦР та ХЦР різного діаметру нами були визначені прогностично несприятливі параметри, які обумовлюють швидке збільшення розміру пухлин. Встановлено, що при збільшенні розмірів гепатоцелюлярного раку в ньому зростає проліферативна активність ракових клітин та зменшується процес їх апоптотичного знищення. У великому гепатоцелюлярному раку діаметром більше 5-ти см, в порівнянні з дрібним (менше 5-ти см) ГЦР, визначається статистично достовірно в 1,4 рази вища площа пухлинних клітин з ядерною експресією Ki67 і майже в 2 рази вища площа p53-позитивних клітин, а площа, займана каспаза-3-позитивними клітинами, в ГЦР різного розміру статистично достовірно не відрізняється. При збільшенні розмірів гепатоцелюлярного раку в ньому створюються умови для інвазивного розповсюдження пухлинних клітин, про що свідчить зростання в 1,6 разів у великому ГЦР площі клітин з експресією матриксної металоротеїнази-9 на тлі незмінної площі клітин з експресією її інгібітора TIMP-1.

При збільшенні розмірів холангіоцелюлярного раку більше 5-ти см в ньому, в порівнянні з дрібним (менше 5-ти см) ХЦР, статистично достовірно зростає (в 1,4 рази) проліферативна активність пухлинних клітин та зменшується їх апоптоз (ядерна експресія p53 зростає в 1,8 рази, а експресія каспази-3 збільшується статистично не достовірно). В холангіоцелюлярному раку діаметром більше 5 ти см площа E-кадгерин-іммунопозитивних клітин статистично достовірно в 2,25 рази менша, ніж в ХЦР діаметром до 5-ти см, а

площа β -катенін-імунопозитивних клітин статистично достовірно майже в 1,7 разів вища, ніж в ХЦР діаметром менше 5-ти см. Одночасно ракові клітини холангіоцелюлярного раку отримують сприятливі умови для інвазивного розповсюдження, про що свідчить статистично достовірне зростання (в 1,3 рази) експресії ними матриксної металопротеїнази-9 на тлі незмінного рівня експресії її тканинного інгібітора TIMP-1.

Таким чином, порівняльний аналіз площ клітин, імунопозитивних по експресії маркерів проліферації та апоптозу, маркерів міжклітинної адгезії та експресії ферментів, що розщеплюють міжклітинний матрикс, в пухлинах різних розмірів показує, що збільшення розмірів гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку супроводжується підвищенням рівня проліферації пухлинних клітин, гіперекспресією ядерного онкопротеїну p53 з блокуванням апоптозу ракових клітин, втратою пухлинними клітинами міжклітинних адгезивних зв'язків і зростанням експресії металопротеїнази-9, що в сукупності сприяє швидкому агресивному і інвазивному росту цих пухлин у печінці. Отримані нами результати підтверджують доцільність використання Міланських критеріїв (Milan criteria) відбору хворих на ГЦР для трансплантації печінки і прогнозування їх виживаності після оперативного лікування, згідно з якими, сприятливим чинником для виживання після трансплантації є наявність одиначної пухлини менше 5-ти см в діаметрі, або наявність декількох вузлів ГЦР не більше 3 см діаметрі [156, 174, 183].

Проведені нами дослідження показали, що, на відмінність від орієнтовного напівкількісного кількісного підрахунку клітин, найбільш об'єктивним методом кількісної оцінки імунопозитивних клітин в пухлині є фотоцифрова морфометрія з використанням програми обробки та аналізу цифрових зображень Image J. Вона дозволяє достовірно оцінити площу розповсюдження CK7, CK20, Her Par 1, AFP, p53, каспаза-3, Ki-67, MMP-9, TIMP-1, E-кадгерин та β -катенін імунопозитивних клітин в ГЦР та а ХЦР печінки, а також в навколишній непухлинній тканині.

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 гепатоцелюлярного раку, холангіоцелюлярного раку 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. Гепатоцелюлярний рак печінки характеризується наявністю трабекулярного, солідно-клітинного і ацинарного мікроскопічних патернів та фіброзного, циротичного і скірозного варіантів пухлини, а також гранулярною цитоплазматичною експресією HerPac-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 СК 8, 7, 19 і 20 пухлинними клітинами. HerPac-1+ і AFP+ клітини займають відповідно $49,35 \pm 25,45\%$ і $37,25 \pm 5,47\%$ стандартизованої площі гістологічного зрізу раку, між рівнями експресії AFP і HerPac-1 має місце прямий слабкий кореляційний зв'язок (коефіцієнт Пірсона $r = +0,25$). Типовим імунофенотипом гепатоцелюлярного раку печінки є HerPac 1 + |AFP + | СК7 +/- |СК8 + |СК19 +/- |СК20 +/- |CA125- |CA19-9 +/- |CDX2- |MUC1- |MUC5AC-.

2. Внутрішньопечінковий холангіоцелюлярний рак печінки характеризується наявністю в рясній фібропластичній стромі тубулярного, солідно-клітинного і залозисто-ацинарного мікроскопічних патернів та скірозного варіанту пухлини, експресією СК7 (у 97,22% хворих), AFP (у 47,22% хворих), СК20 (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±9,93%, 50,28±16,35% і 17,25±9,67% СПГЗ раку. Характерним імунофенотипом холангіоцелюлярного раку печінки є CK7 + | CK8 +/- | CK19 + | CK20 +/- | CA125 + | CA19-9 + | CDX2 +/- | MUC1+ | MUC5AC + | AFP +/- | HerPar 1 -.

3. Для гепатоцелюлярного і внутрішньопечінкового холангіоцелюлярного раку печінки 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 гепатоцелюлярному раку і у 74,36% хворих в холангіоцелюлярному раку печінки, Ki-67-позитивні клітини займають відповідно 57,18±15,92% і 54,21±22,18% стандартизованої площі гістологічного зрізу цих пухлин. Гіперекспресія і висока експресія ядерного білка p53 в пухлинних клітинах виявляється у 83,64% хворих в гепатоцелюлярному раку і у 61,54% хворих в холангіоцелюлярному раку печінки на тлі низької експресії каспази-3 у 47,28% хворих в гепатоцелюлярному раку і у 48,72% хворих в холангіоцелюлярному раку печінки.

4. Гепатоцелюлярний і холангіоцелюлярний рак печінки відрізняються високим інвазивним потенціалом. У 92,73% хворих на гепатоцелюлярний рак і у 89,74% хворих на холангіоцелюлярний рак печінки визначається експресія MMP-9 в цитоплазмі злюкисних клітин, які займають більше половини стандартизованої площі гістологічного зрізу цих пухлин, в той час як TIMP-1-позитивні клітини займають всього 21,94±6,27% і 33,05±13,85% стандартизованої площі гістологічного зрізу 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). Гепатоцелюлярний і холангіоцелюлярний рак 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 гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки, які свідчать про схильність до інвазивного розповсюдження і збільшення розміру пухлин понад 5 см, є статистично достовірне зростання рівня експресії злоякісними 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 відмінність від гепатоцелюлярного раку, метастази в печінку злоякісних пухлин солідно-трабекулярної структури характеризуються відсутністю експресії гепатоцитарних маркерів (HepPar-1, AFP) і можуть бути ідентифіковані за своїм імуногістохімічним 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. Холангіоцелюлярний рак печінки і метастази в печінку протокового раку підшлункової залози, аденокарциноми шлунка та колоректального раку тубулярної і залозисто-ацинарної структури мають подібний варіабельний рівень імуногістохімічної 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 первинного раку печінки і метастатичних пухлин печінки враховується мікроструктура пухлин, їх імуногістохімічна характеристики і дані клініко-інструментального обстеження хворих.

1. На першому етапі визначається мікроструктура, основні патерни і виразність фіброзної стромы пухлини. Застосовується імуногістохімічна панель з 5-ти антитіл (PanCK, HepPar-1, LCA, Vimentin, S100) для орієнтовного визначення імунофенотипу пухлини.

2. Ключовими параметрами диференційної діагностики гепатоцелюлярного і холангіоцелюлярного раку печінки є їх типова мікроструктура і імуногістохімічний профіль. Для гепатоцелюлярного раку: 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 імуногістохімічної діагностики гепатоцелюлярного раку і метастатичних пухлин печінки 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 холангіоцелюлярного раку і метастатичних пухлин печінки гніздово-клітинної, дуктулярно-тубулярної, залозисто-ацинарної, фіброзно-циротичної структури визначається імуногістохімічна експресія CK7, CK20, MUC1, MUC2, MUC 5AC, CDX2 і TTF-1.

5. Диференційний діагноз між холангіоцелюлярним раком печінки та метастазом в печінку протокового рака підшлункової залози, рака шлунка

або товстої кишки проводиться з урахуванням їх імуногістохімічних характеристик та даних ендоскопічного і комп'ютерно-томографічного обстеження хворих.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абраменко И.В. Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии/ И.В. Абраменко, А.А. Фильченков // Вопр онкол. – 2003. – Т.49. - № 1. – С.21– 30.
2. Абдуллаев Р.Я. Ультразвукова семіотика раку печінки/ Р.Я.Абдуллаев, Ф.Н. Горлеку // Український радіологічний журнал. - 2008. - Т. 16. - №4. - С.386-391.
3. Альфа-фетопротеин/[С. Ю.Родионов, В.А.Черкасов, Н.Н. Малютина, О.А. Орлов] - Екатеринбург: УрО РАН. - 2004. - 376с.
4. Бабиченко И.И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста/ И.И.Бабиченко, В.А.Ковязин//. – М. - 2008. – 109с.
5. Базин И.С. Гепатоцеллюлярный рак – современное состояние проблемы / И.С. Базин // Практическая онкология. – 2008. – Т.9. - №4. – С.216–228.
6. Болонди Л. Печеночно-клеточный рак /Л.Болонди, А.Л.Чэн, А.М. Бишелье// Изд. Дом «Практика».- 2010. – С. 13-22.
7. Бредер В.В. Практические рекомендации по лекарственному лечению больных первичным раком печени /В.В.Бредер, В.Ю.Косырев, Н.В.Брежнев// Практические рекомендации по лечению злокачественных опухолей. RUSSCO. – Москва. – 2012. – С.139-144.
8. Гахраманов Али Джандар оглы. Гепатоцеллюлярный рак - хирургическое лечение, факторы прогноза. Автореф. дисс.... канд.мед.наук 14.00.14-онкология. – М. -2007. – 28с.
9. Гепатоцеллюлярный рак на фоне цирроза: возможности хирургического лечения /[Ю.И. Патютко, Е.С. Чучуев, Д.В. Подлужный, М.Г. Агафонова]// Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2011. - № 10. – С.13-19.
10. Гусарев С.А. Патологоанатомическая характеристика первичного и метастатического рака печени /С.А. Гусарев// Автореф. дисс. канд.мед наук. 14.00.15 – патологическая анатомия. - М.- 2006. – 26с.

11. Глузман Д.Ф. Диагностическая иммуногистохимия опухолей /под. ред. Д.Ф. Глузмана// К.: Морион.- 2003. – 193 с.
12. Значение иммуногистохимии для изучения новообразований печени: дифференциальный диагноз, прогностические маркеры /Д.А.Гранов, К.М.Пожарисский, В.П.Тен [и др.] / Вопросы онкологии. – 2008. - №4. - С.417-433.
13. Зубко М.Д. Гистоархитектоника и иммуно-гистохимические маркеры гепатоцеллюлярной карциномы печени / М.Д.Зубко // В сб.: Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я. Запоріжжя. – 2015. – С.18-19.
14. Зубко М.Д. Индивидуальная вариабельность экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени/ М.Д.Зубко // В кн.: Медицина ХХІ століття: перспективні та пріоритетні напрями наукових досліджень (Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції 24-25 липня 2015 р.). - Дніпропетровськ. - 2015. - С.67-70.
15. Зубко М.Д. Особенности экспрессии цитокератинов 7 и 20 клетками гепатоцеллюлярного раке в трепанобиоптатах печени / М.Д.Зубко // В сб.: Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках. - Київ. - 2014. - С.40-41.
16. Зубко М.Д. Особенности экспрессии цитокератинов 7 и 20 клетками холангицеллюлярного рака в трепанобиоптатах печени / М.Д.Зубко // В кн.: Нові досягнення у галузі медичних та фармацевтичних наук (Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції 5-6 грудня 2014 р.). - Одеса. - 2014. С.61-63.
17. Зубко М.Д. Особливості експресії HbcorAg і HbsAg антигенів клітинами гепатоцеллюлярного раку в трепанобіоптатах печінки / М.Д.Зубко , В.А. Туманский// В кн.: Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках(Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції 26-27 грудня 2014 р.). - Львів - 2014.- С.98-99.

18. Зубко М.Д. Порівняльна імуногістохімічна характеристика рівня проліферації та апоптозу в холангіоцелюлярному та гепатоцелюлярному раку печінки // М.Д.Зубко, В.О.Туманский // В кн.: Світова медицина: сучасні тенденції та фактори розвитку (Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції 30-31 січня 2015 р.). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». -2015. – С.98-100.

19. Зубко М.Д. Характеристика уровня экспрессии E-кадгерина и β -катенина в гепатоцелюлярном и холангиоцелюлярном раке печени / М.Д.Зубко // Патологія. – 2015. - № 2(34). – С.64-70.

20. Ивашкин В.Т. Болезни печени и желчевыводяих путей/ В.Т.Ивашкин // - М.: Изд. дом «М-Вести».- 2002. – С. 405–410.

21. Ивашкин В.Т. Гастроэнтерология: национальное руководство/под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа.- 2008.- 345 с.

22. Ивашкин В.Т. Скрытая инфекция вирусом гепатита В/ В.Т.Ивашкин, Е.Н.Герман, М.В.Маевская // РЖГГК. – 2008. – Т. 18. - № 2. – С.4-9.

23. Іщенко Р.В. Профілактика та лікування метастатичного ураження печінки при колоректальному раку/ Р.В. Іщенко // Автореф.дис....доктора мед наук. 14.01.07 – онкологія. - Донецьк. – 2012. - 38с.

24. Киясов А.П. Овальные клетки – предполагаемые стволовые клетки или гепатобласты? /А.П. Киясов, А.А. Гумерова, М.А. Титова// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2006.- № 2 (4). - С.55-58.

25. Колосов А.Е. Рак печени и прогноз для больных/ А.Е.Колосов, В.А. Журавлев // Санкт-Петербург. – 2002. - 144 с.

26. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены / Б.П. Копнин - В кн.: Канцерогенез / Под ред. Д. Г. Заридзе // — М.: Медицина. 2004. - 576 с. - С. 125-157.

27. Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста/ Б.П. Копнин //В: Материалы X Российского онкологического конгресса. Москва. - 2006. - С.99–102.

28. Лазаревич Н.Л. Молекулярные механизмы прогрессии опухолей печени / Н.Л. Лазаревич // Успехи биол. химии. - 2004. –Т.44. – С.365-418.
29. Молекули адгезії та їх значення при розвитку злоякісних пухлин/ [Поліщук Л.З., Рябцева О.Д., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф.] - Онкологія. - 2011. - Т.13. - № 1. – С.4-10.
30. Пат 99314 Україна, МПК 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів/В.О.Туманський, А.В.Євсєєв, І.С. Коваленко, М.Д. Зубко; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т.; заявл. 29.12.14.; опубл. 25.05.15, Бюл. №10.
31. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека/ С.В. Петров, Н.Т.Райхлин // – Казань: «Титул». – 2004. - 456 с.
32. Туманский В. А. Количественные показатели экспрессии стромальных маркеров в поджелудочной железе при протоковой аденокарциноме и хроническом панкреатите / В. А. Туманский, А. В. Евсеев, И. С. Коваленко // Патологія. – 2015. – № 2, № 3. – С.26-30.
33. Туманский В.А. Гепатоцеллюлярная карцинома: особенности микроструктуры и экспрессии HerPar-1, альфа-фетопротейна, цитокератинов 7 и 20/ В.А.Туманский, М.Д.Зубко // Патологія. - 2014. – №1 (30). – С. 45-50.
34. 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.
35. 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.
36. Туманский В.А. Особенности экспрессии HerPar-1 и альфа-фетопротейна в гепатоцеллюлярном раке печени/ В.А.Туманский, М.Д.Зубко // В кн.: Роль та місце медицини у забезпеченні здоров'я людини у сучасному

суспільстві: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції. - Одеса. – 2014. – С.164-165.

37. Туманский В.А. Рак печени: особенности экспрессии антигенов вирусного гепатита В/ В.А.Туманский, М.Д.Зубко // Патологія. - 2013. – №3 (29). – С.33-37.

38. 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

39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. 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.

43. Туффаха М. Иммуногистохимическая диагностика опухолей / М. Туффаха, С.Г. Гичка, Г. Гуски // К.: Интермед.- 2013. – 223 с.

44. Факторы риска развития гепатоцеллюлярной карциномы/ В.Т.Ивашкин, М.А.Морозова, М.В.Маевская [та інш.] // РЖГГК. - 2009. - Т.19, №1.- С. 4-15.
45. Чебнэр Б.Э. Руководство по онкологии // Б.Э.Чебнэр, Томас Дж. Линч, Дэн Л. Лонго; пер. с англ.; под общ. ред. акад. РАЕН, проф. В.А.Хайленко. - М.: МЕДпресс-информ. - 2011. - С.441-447.
46. Щёголев А.И. Современная TNM-классификация опухолей печени и желчных протоков /А.И.Щёголев, Е.А.Дубова, К.А.Павлов// Медицинская визуализация. - 2011. - №2. - С.8-12.
47. Ярошенко Е.Б. Роль вирусных гепатитов в развитии гепатоцеллюлярной карциномы /Е.Б. Ярошенко, Э.З. Бурневич, Я.Г. Мойсюк // Практическая онкология. –2008. – Т.9. - №4. – С.189–193.
48. 14-3-3sigma negatively regulates the cell cycle, and its down-regulation is associated with poor outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma /Y. Kuroda, S. Aishima, A. Taketomi [et al.] // Hum Pathol. - 2007. - V. 38. -№ 7. -P.1014-1022.
49. A matrix metalloproteinase inhibitor to treat unresectable cholangiocarcinoma / J.J.French, M. J.Midwinter, M. K. Bennet [et al.] // HPB (Oxford). – 2005. – V.7. - №4. – P.289-297.
50. A Study on Angiogenesis-Related Matrix Metalloproteinase Networks in Primary Hepatocellular Carcinoma/ Y.Ishii, Y.Nakasato, S.Kobayashi [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2003. – V.22. - №3. – P.461-470.
51. AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed./ Eds Edge S.B., Byrd D.R., Carducci M.A. [et al.] // New York: Springer. - 2009. – 718p.
52. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma /Z.H. Gao, M.S.Tretiakova, W.H.Liu [et al.] // Mod Pathol. – 2006. – V.19, № 4 – P.533-540.
53. Basturk O. Immunohistology of the Pancreas, Biliary Tract and Liver/ O.Basturk, A.B. Farris, N. V. Adsay// In: Diagnostic immunohistochemistry:

theranostic and genomic applications / Ed. by David J. Dabbs.—3rd ed. – Philadelphia: Saunders/Elsevier – 2010. - P.541-592.

54. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: hepatocellular carcinoma versus metastatic neoplasms / [S.Kakar, A.M.Gown, Z.D.Goodman, L.D. Ferrell] // Arch Pathol Lab Med. - 2007. - V.131. - P.1648-1654.

55. β - Catenin expression in hepatocellular carcinoma: A possible participation of β -catenin in the dedifferentiation process/ T.Suzuki, H. Yano, Y. Nakashima [et al.] // M. J Gastroenterol Hepatol. - 2002.- V.17. - № 9. - P.994-1000.

56. β -Catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification /S.P. Monga, H.K. Monga, X. Tan [et al.]// Gastroenterology. - 2003. - V.124. - P.202–216.

57. β -Catenin is temporally regulated during normal liver development/ A. Micsenyi, X. Tan, T. Sneddon [et al.] // Gastroenterology. - 2004. - V.126.- P.1134–1146.

58. Blechacz B.R.Cholangiocarcinoma /B.R. Blechacz, G.J.Gores // Clin Liver Dis.- 2008. - V.12. - P.131-150.

59. Burt A.D. MacSween's Pathology of the Liver / A.D. Burt, B.C.Portmann, L.D. Ferrell// 6th edn. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier. - 2012. -1032 p.

60. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012/ J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit [et al.] // Int J Cancer. – 2015. – V.136. - № 5. - E359- E386.

61. Cancer statistics, 2008/ A. Jemal, R. Siegel, E. Ward [et al.] // CA Cancer J Clin. - 2008. - V.58. - P.71–96.

62. Carcinoma of unknown primary: check the liver thanks to TTF-1/[M.Mishra, V.Morgan, AK Hamati, M.Al-Abbadi] // Tenn Med. - 2012. - V.105. - №1. - P.35-36

63. Cardinale V. Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity /V. Cardinale, G. Carpino, L. Reid [et al.]// World J Gastrointest Oncol. – 2012. - V.4. – P.94–102.
64. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas / [R.W. Werling, H. Yaziji, C.E. Bacchi, A.M. Gown] // Am J Surg Pathol. – 2003. – V.27. - № 3. – P.303-310.
65. Cells of origin and cancer stem cells in cholangiocarcinoma /G Carpino, V Cardinale, L Reid // Transl Gastrointest Cancer. – 2012. - V.1. – P.33-43.
66. Centeno B.A. Pathology of Liver Metastases/ B.A. Centeno // Cancer Control. - 2006. - V.13. - N.1. - P.13- 26.
67. Changes in WNT/ β -catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration/ S.P. Monga, P. Pediaditakis, K. Mule [et al.] // Hepatology. - 2001. - V. 33. - P.1098–10109.
68. Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the “Cholangiocarcinoma” committee of the Italian Association for the Study of Liver disease/ D. Alvaro, MC Bragazzi, A. Benedetti [et al.] // Dig Liver Dis. - 2011. - V.43. - P.60-65.
69. Cholangiocarcinoma/[S.A.Khan, H.C.Thomas, B.R.Davidson, S.D. Taylor-Robinson].-Lancet. – 2005. - V.366. – P.1303-1314.
70. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors/ M..C Bragazzi, V .Cardinale, G. Carpino [et al.] // Transl Gastrointest Cancer. – 2012. – V.1. - P. 21-32.
71. Cholangiocarcinoma: increasing burden of classifications / V. Cardinale, M.C Bragazzi, G. Carpino [et al.] // Hepatobiliary Surg Nutr. – 2013. – V.2. - №5. – P.272-780
72. Cholangiocarcinoma: update and future perspectives/ M. Gatto, M.C. Bragazzi, R. Semeraro, [et al.] // Dig Liver Dis. - 2010.- V.42. - P.253-260.

73. Classification of Tumours of the Digestive System, 4th/ [F.T. Bosman, F.Carneiro, R.H.Hruban, N.D. Theise].- Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Press – 2010. – 417 p
74. Clonorchis sinensis infection and increasing risk of cholangiocarcinoma in the Republic of Korea/ M.K. Lim, Y.H. Ju, S. Franceschi [et al.] // Am J Trop Med Hyg. - 2006. - V.75. - №1. - P.93–96.
75. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumour cells: implication for cancer specific therapy/ [L.Yang, Z.Cao, H.Yan, W.C. Wood] // Cancer Res. - 2003. - V.63. - P.6815-6824
76. Colombo M. Treatment of hepatocellular carcinoma: beyond international guidelines/ M. Colombo, A.Sangiovann // Liver International. – 2015. – V.35. - № 1. - P.129–138
77. Colorectal Liver Metastases: CT, MR Imaging, and PET for Diagnosis/ S.Bipat, M.S.van Leeuwen, E.F.Comans [et al.] // Meta-Analysis. Radiology. - 2005. - V.237. - №1. - P.123–131
78. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence / F.Zhang , X .P.Chen , W. Zhang [et al.] // Histopathology. – 2008. – V.52. – P.224–232
79. Comparative analysis of immunohistochemical markers for differential diagnosis of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma / H.S Ryu, K Lee, E. Shin. [et al.] // Tumori. – 2012. – V.98. - №4. – P.478-484
80. Comparative analysis of resection and liver transplantation for intrahepatic and hilar cholangiocarcinoma: A 24-year experience in a single center/ J.C.Hong, C.M.Jones, J.P. Duffy // Arch Surg. – 2011. –V.146. – P.683-689
81. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma / [S.K. Lau, S.Prakash, S.A.Geller, R.Alsabeh] // Hum. Pathol. - 2002. – V.33. - № 12. – P.1175–1181

82. Comparison of incidence of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma-focus on East and South-Eastern Asia / H.R. Shin, Oh J.K, Eric Masuyer [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev.* - 2010. - V.11. - № 5. - P.1159-1166
83. Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy /O.Ramuz, D.Isnardon, E.Devillard [et al.] // *Int J Exp Pathol.* – 2003. – V. 84(2). – P. 75–81
84. Correlation of p53 gene mutation and expression of P53 protein in cholangiocarcinoma/ X.F. Liu, H. Zhang, S.G Zhu. [et al.] // *World J Gastroenterol* . -2006. - V.12. - №29. - P.4706-4709.
85. Cougot D. HBV induced carcinogenesis/ D.Cougot, C.Neuveut, M.A. Buendia // *J. Clin. Virology.* – 2005. – V. 34. - № 1. – P.75-78.
86. Current concepts in the immunohistochemical evaluation of liver tumors / [A.K.Koehne de Gonzalez, M.A.Salomao, S.M. Lagana] // *World J Hepatol.* – 2015. – V.7. - №10. - P.1403-1411.
87. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects/[A.Forner, M.E.Reig, C.R.de Lope, J.Bruix] // *Semin Liver Dis.* – 2010. – V.30. – P.61–74.
88. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer/ [E.Van Aken, O.De Wever, A.S.Correia da Rocha, M.Mareel]//*Virchows Arch.* - 2001. - V.439. - № 6. -P.725-751.
89. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma in Italy/ D. Alvaro, E. Crocetti, S.Ferretti [et al.] // *Dig Liver Dis.* - 2010. - V. 42. - P.490-495.
90. Descriptive epidemiology of cholangiocarcinoma and clonorchiasis in Korea/ H.R Shin, Oh J.K., M.K. Lim [et al.]// *J Korean Med Sci.* - 2010. - V.25. - P.1011-1016.
91. Desmoplastic Reaction in Pancreatic Cancer. Role of Pancreatic Stellate Cells / M.V. Apte, S. Park, P.A. Phillips et al. // *Pancreas.* – 2004. – V.29. – P. 179–187.

92. Differential diagnosis of malignant epithelial tumours in the liver: an immunohistochemical study on liver biopsy material / [N.AIMuhannadi, N.Ansari, U.Brahmi, A.Abdel Satir] // *Ann Hepatol.* – 2011. – V.10. - № 4. – P.508-515.
93. Differing rates of loss of DPC4 expression and of p53 overexpression among carcinomas of the proximal and distal bile ducts/P. Argani, A. Shaukat, M. Kaushal [et al.] // *Cancer.* – 2001. - V.91. - № 7. - P.1332-1341.
94. Distal bile duct carcinoma: prognostic factors after curative surgery. A series of 112 cases /Q. Cheng, X. Luo, B. Zhang [et al.] // *Ann Surg Oncol.* - 2007. - V.14. - № 3. - P. 1212-1219.
95. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry / W.M. Coston, S. Loera , S.K. Lau [et al.] // *Am J Surg Pathol.* – 2008. – V.32. - № 3. – P.433-444.
96. Eckell F. Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению при раке желчного пузыря и желчных протоков / F. Eckell T. Brunner, S. Jelic// Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) – М.: Изд. гр. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010. – С. 103–109.
97. Edmondson H.A. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies/ H.A.Edmondson, P.E. Steiner // *Cancer.* - 1954.- V.7.- P.462–504.
98. El-Serag H.B. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States/ H.B. El-Serag // *Gastroenterology.* – 2004. – V.127. - N5 (suppl. 1). – P. 27–34.
99. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008/ J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray [et al.] // *Int J Cancer.* – 2010. – V.127. - № 12. - P.2893-2917.
100. Everson G.T. Long term outcome of patients with chronic hepatitis C and decompensated liver disease treated with the LADR protocol (low accelerating dose regimen) / G.T.Everson, J.F.Trotter, M. Kugelmas // *Hepatology.* – 2002. – V.36. – Abstract.

101. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma / X.D. Zhou, Z.Y. Tang, B.H. Yang [et al.] // *Cancer*. - 2001. - V.91. - P.1479–1486.

102. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Apomucins, Matrix Metalloproteinases, and p53 in Rat and Human Cholangiocarcinoma /Jan Yi-Yin, Yeh Ta-Sen, Yeh Jun-Nan [et al.] // *Ann Surg*. – 2004. – V.240, №1. – P. 89–94.

103. Expression of epidermal growth factor receptor, ErbB2 and matrix metalloproteinase-9 in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma /H.J Kim, J.S. Kim, C.D Kang [et al.] // *Korean J Gastroenterol*. – 2005. - V.45. - №1. – P.52-59.

104. Expression of matrix metalloproteinase 7 is an unfavorable postoperative prognostic factor in cholangiocarcinoma of the perihilar, hilar, and extrahepatic bile ducts/ K. Itatsu, Y. Zen, J. Yamaguchi [et al.] // *Hum Pathol*. - 2008. -V.39. - №5. – P.710-719.

105. Expression of matrix metalloproteinase-9 in surgically resected intrahepatic cholangiocarcinoma / K. Shirabe, M. Shimada, K. Kajiyama [et al.] // *Surgery*. – 1999. – V.126. - №5. – P.842-846.

106. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact/ S.Y Park, S.J Roh, Y.N Kim [et al.] // *Oncol Rep*. – 2009. - V.22. - №3. – P.649-657.

107. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma /C. Stroescu, A. Dragnea, B. Ivanov [et al.] // *J gastrointestinal and liver diseases*. - 2008. - V.17. - № 4. - P. 411-417.

108. Expression of Survivin and Caspase - 3 in cholangiocarcinoma and relationship with HBV infection/ [WU Ying - ying; WU Yi - qi; Tian - zhen WANG; Xiao - hui BAI] // *J Harbin Medical University*. - 2014-1. Chinese.

109. Expression of Survivin and Caspase - 3 protein and their correlation with prognosis in patients with cholangiocarcinoma/ XU Peng, Qiang HUANG, Chen - hai LIU [et al.] // *Shandong Medical Journal*. – 2011-35. Chinese.

110. Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma / Joo Young-Eun, Seo Young-Ho, Lee Wan-Sik [et al.] // Korean J Intern Med. - 2000. - V.15. - № 3. - P.171-178.

111. Expression of Wnt-5a and β -catenin in primary hepatocellular carcinoma/ Li Peifeng, Cao Yongcheng, Li Yamin [et al.] // Int J Clin Exp Pathol. - 2014. - V.7. - №6. - P.3190–3195.

112. Expression of β -catenin in hepatocellular carcinoma/ Liem Thanh Tien, Ito Masahiro, Mikiko Nakao [et al.] // World J Gastroenterol. - 2005. - V.1. - №16. -P.2398-2401.

113. Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation / D.Nart, B.Yaman, F.Yilmaz [et al.] // J Liver Transplantation. – 2010. – V.16. - №5. – P.621-630.

114. Expression patterns of E-cadherin and beta-catenin according to clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma/ S.H. Bae, E.S. Jung , Y.M. Park [et al.] // Taehan Kan Hakhoe Chi. - 2002. - V.8. - №3. - P.297-303.

115. Fan Z.J. Expression of estrogen receptor and progesterone receptor in hilar cholangiocarcinoma and their clinical significances /Z.J.Fan, Y.Wu, Z.J.Wang// Zhonghua Yi Xue Za Zhi. - 2005. - V.85. - P.2651-2653.

116. Fas - mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells is enhanced by 3,3'- Diindolylmethane through inhibition of AKT signaling and Flick - like inhibitory protein/ Y. Chen, J.Xu, N. Jhala [et al.] // Am J Pathol. - 2006. - V.169. - P.1833-1842.

117. Feitelson M. Chronic hepatitis C virus infection and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma/ M. Feitelson // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). - 2001. - V.49. - №.2. - P.65-74.

118. Ferrel L. Tumors of the Liver. Biliary Tree and Gallbladder // In: Diagnostic histopathology of tumors/ L.Ferrel, S.Kakar// Ed. Ch.D.M.Fletcher: ELSEVIER Saunders: Philadelphia. 4 Ed.- V.4. - 2013. – P.477-530.

119. Fibrolamellar carcinoma of the liver exhibits immunohistochemical evidence of both hepatocyte and bile duct differentiation/ S.C. Ward, J. Huang, S.K. Tickoo [et al.] // *Modern Pathology*. - 2010.- V.23. - № 9. – P.1180–1190.

120. Fibrolamellar hepatic tumor with neurosecretory features and systemic deposition of AA amyloid /[J. Lloreta, C. Vadell, X. Fabregat, S.Serrano]// *Ultrastructural Pathology*. - 1994. - V.18(1-2). - P.287–292.

121. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison with conventional hepatocellular carcinoma /[H.M. Abdul-Al, Wang Guanghua, H.R. Makhlof, Z.D.Goodman] // *Int J Surg Pathol*. - 2010. - V.18. - № 5. - P.313–318.

122. Fleming I.D. International Joint Committee of Cancer (IJCC). Cancer Staging Manual, 7th ed. / Dedicated I.D. Fleming // Springer: New York-Dordrecht –Heidelberg-London. – 2010. – 648p

123. Geller S.A. Primary and Metastatic Malignant Tumors of the Liver / S.A.Geller, L.M. Petrovic // In: *Biopsy Interpretation of the Liver*, 2nd ed. - Lippincott Williams & Wilkins (LWW). – 2009. – 416p.

124. Ghittoni G., Noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma: a boat that leaks like a sieve / G.Ghittoni, E.Caturelli, S. Rossi // *Hepatology*. - 2010. – V.52. - №4. – P.1515–1516.

125. Gleiberman A.S Cell position and cell interactions in expression of fetal phenotype of hepatocyte/ A.S. Gleiberman, G.I. Abelev // *Int. Rev. Cytol*. - 1985. - V. 95. - P.229-266.

126. Global cancer statistics, 2002/ [D.M. Parkin, F.Bray, J.Ferlay, P.Pisani] // *CA Cancer J Clin*. - 2005. - V.55. - № 2. - P.74–108.

127. Goodman Z.D. Neoplasms of the liver/ Z.D. Goodman // *Modern Pathology*. – 2007. – V.20. – P. 49–60.

128. Graig J.R. Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts /J.R.Graig, R.L.Peters, H.A.Edmondson // Washington, DC: AFIP. - 1989.- 2nd series. – V. 26. - 280 P.

129. Guedj N. Anatomopathologie des cholangiocarcinomes/ N.Guedj, P.Bedossa, V.Paradis// Ann Pathol. – 2010. – V.30. - № 6. – P.455-463.
130. Hahn W.C. Rules for making human tumor cells/ W.C. Hahn, R.A. Weinberg // N Engl J Med. -2002. - V.347. - №20. - P.1593–1603.
131. Hanahan D. The Hallmarks of Cancer/ D. Hanahan, R.A. Weinberg// Cell. - 2000. - V.100. - P.57–70.
132. Hashem B. Epidemiology of hepatitis C-related hepatocellular carcinoma /B.Hashem, H.B.El-Serag// Medscape Gastroenterology. – 2007. – <http://www.medscape.com/viewarticle/560012>.
133. Havlik R. Results of resection for hilar cholangiocarcinoma with analysis of prognostic factors / R. Havlik, E. Sbisa, A.Tullo // Hepatogastroenterology. - 2000.- V. 47. - №34. - P.927-931.
134. Hepatic expression of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein in HBV or HCV cirrhosis in relation to dysplastic liver cell changes and hepatocellular carcinoma/ J.Koskinas, K.Petraki, N.Kavantzias [et al.]// Viral Hepatitis. - 2005. - V.12. - №6. - P. 635-641.
135. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Haras gene mutations /N .Harada, H. Oshima, M. Katoh [et al.] // - Cancer Res. - 2004. - V.64. - № 1. - P.48-54.
136. Hepatocellular carcinoma treated with interventional procedures: CT and MRT follow-up / Y.Guan, L.Sun, X. Zhou [et al.]// World J. Gastroenterol. -2004. - V.24. - № 10. - P.3543–3548.
137. Hepatocellular carcinoma/ S.Hirohashi, K.G.Ishak, M.Kojiro [et al.]// In: Hamilton S.R., Aaltonen L.A., eds. Tumours of the Digestive System. - Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC). – 2000. – P.159-172.
138. Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples / A. Lugli, L. Tornillo, M. Mirlacher [et al.] // Am J Clin Pathol. –2004. – V.122. – P. 721–727.

139. Histological Diversity in Cholangiocellular Carcinoma Reflects the Different Cholangiocyte Phenotypes /M. Komuta, O.Govaere, V Vandecaveye [et al.]// Hepatology. - 2012. - V.55. – P.1876-1888.

140. Histopathology of hepatocellular carcinoma/ [M.Schlageter, L.M. Terracciano, S.D'Angelo, P.Sorrentino] // World J Gastroenterol. – 2014. – V.20. - № 43. – P.15955–15964.

141. HIV coinfection shortens the survival of patients with hepatitis C virus-related decompensated cirrhosis /J.A.Pineda, M.Romero-Gomez, F. Diaz-Garcia [et al.] // Hepatology. – 2005. – V.41. - № 4. – P. 779–789.

142. Ijin Joo Cancer Stem Cells in Primary Liver Cancers: Pathological Concepts and Imaging Findings/ Joo Ijin, Kim Haeryoung, Min Lee Jeong // Korean J Radiol. – 2015. - V.16. - №1. – P.50-68.

143. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules/ A. Saftoiu, T. Ciurea, C. Georgescu [et al.] // J Cell Mol Med. - 2003. - V.7. - №4. - P.436-446.

144. Immunohistochemical pitfalls and the importance of glypican 3 and arginase in the diagnosis of scirrhous hepatocellular carcinoma /G.Krings, R.Ramachandran, D.Jain [et al.] // Mod Pathol. – 2013. – V.26. – P.782-791.

145. Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma/ Makoto Shibuya, Fukuo Kondo, Keiji Sano [et al.]// J Hepato-Biliary-Pancre Science. – 2011. – V.18. – P.537–543.

146. Immunoreactivity of HepPar-1 in hepatic and extrahepatic tumors and its correlation with albumin in situ hybridization in hepatocellular carcinoma / S .Kakar, M T.uir, L.M Murphy [et al.] // Am J Clin Pathol. - 2003. - V.119. - P.361-366.

147. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas/ N.Theret, O.Musso, B. Turlin [et al.] // Hepatology. – 2001. – V.34. - № 1. – P.82-88.

148. Increased long-term survival among patients with hepatocellular carcinoma after implementation of Model for End-stage Liver Disease score / RJ

Wong, P Devaki, L Nguyen [et al.] // Clin Gastroenterol Hepatol. – 2014. –V.12. – P.1534–1540.

149. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma/ Y.Hoshida, S.M.Nijman, M. Kobayashi [et al.] // Cancer Res. - 2009. – V.69. - № 18. – P.7385-7392.

150. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors / V Cardinale, R Semeraro, A Torrice [et al.] // World J Gastrointest Oncol. - 2010. - V.2. - P.407-416.

151. Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in cirrhotic liver frequently expressed p63-positive basal / stem-cell phenotype / K.Nomoto, K.Tsuneyama, C.Cheng [et al.] // Pathol Res Pract. - 2006.- V.202. - P.71-76.

152. Intrahepatic Cholangiocarcinoma. In: Bosman FT, Cameiro RH, Theise ND, editors. WHO Classification of tumors of the digestive system / Y.Nakanuma, M.Curado, S.Franceschi [et al.] // Lyon: IARC Press. - 2010. - P.217-224.

153. Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatitis C and B virus infection, alcohol intake, and hepatolithiasis: a case-control study in Italy/ F.Donato, U.Gelatti, A.Tagger [et al.]// Cancer Causes Control.- 2001.- Vol. 12, № 10:-P. 959–64.

154. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Prognostic factors after surgical resection/ A.Guglielmi, A.Ruzzenente, T. [et al.] Campagnaro // World J Surg. - 2009. –V.33. – P.1247-1254.

155. Invasive papillary carcinomas of the extrahepatic bile ducts: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 13 cases/ M.P. Tsuneyoshi Hoang, L.A. Murakata, N. Katabi [et al.] // Mod Pathol. - 2002. - V.15. - № 12. - P.1251-1258.

156. Ioannou G.N. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival /G.N.Ioannou, J. D.Perkins, R. L.Carithers // Gastroenterology. - 2008. - V.134. - №5. - P.1342-1351.

157. Isolation and characterization of biliary epithelial and stromal cells from resected human cholangiocarcinoma: a novel in vitro model to study tumor-stroma interactions/ M. Massani, T Stecca, L. Fabris [et al.] // *Oncol Rep.* – 2013. – V.30. – P.1143-1148.

158. Jakate Sh. Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma / Sh.Jakate, D. Giusto // In: *Liver Pathology*. Eds. L.D.Ferrel, S.Kakar. – demosMEDICAL. - New York. – 2011.- Vol. 4. - №24. - P. 419-420

159. Jelic S. Гепатоцеллюлярный рак: клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению /S.Jelic, G.C.Sotiropoulos.- В кн.: Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) М.: Изд. гр. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН// - 2010.-436 с.

160. Karabork A. The best immunohistochemical panel for differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic adenocarcinoma /A.Karabork, G. Kaygusuz, C.Ekinci // *Pathol Res Pract.* – 2010. – V.206. - № 8. – P.572-577.

161. Karaliotas Christoph Constantine Liver and Biliary Tract Surgery /Christoph Karaliotas, E. Broelsch, A. Nagy Habib // SpringerWien NewYork. – 2006. – 279 p.

162. Kasper H.U. Liver metastases: incidence and histogenesis/ H.U. Kasper, U.Drebber, V.Dries// *Z. Gastroenterol.* - 2005. – V.43. - № 10. – P.1149-1157.

163. Kenna B. Pathology of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and combined hepatocellular-cholangiocarcinoma /B.Kenna, Sh. Bihlmeyer// In: *Primary Carcinomas of the Liver.* – Ed. Adviser J.E. Husband: Cambridge University Press. - 2010. – P.16-32.

164. Kirimlioglu H. Pathological Aspects of Hepatocellular Tumors/ H.Kirimlioglu, A.J.Demetris, M.A.Nalesnik// From: *Current Clinical Oncology: Hepatocellular Cancer: Diagnosis and Treatment*. Edited by: B. I. Carr © Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. – 2005. - P.77-115.

165. Kisha M. Biliary neoplasms/ M.Kisha, J.Dhanpat // In: Liver Pathology. / Eds. L.D.Ferrel, S.Kakar. – demosMEDICAL. - New York. – 2011. V.4. – Ch.24. – P.361-364.
166. Koehne de Gonzalez A.K. Current concepts in the immunohistochemical evaluation of liver tumors /A.K.Koehne de Gonzalez, M.A.Salomao, S.M. Lagana// World J Hepatol. – 2015. – V.7. - №10. - P.1403-1411.
167. Komuta M. Histological Diversity in Cholangiocellular Carcinoma Reflects the Different Cholangiocyte Phenotypes /M.Komuta, O.Govaere, V.Vandecaveye [et al.]// Hepatology. - 2012. - V.55. – P.1876-1888.
168. Kondo F. Histological features of early hepatocellular carcinomas and their developmental process: for daily practical clinical application /F. Kondo// Hepatology Intern. – 2009. – V.3. - № 1. – P. 283–293.
169. Lau W.Y. Hepatocellular Carcinoma / W.Y. Lau// Clinical Research Publisher InTech.- 2012.- 330 p.
170. Lazaridis K.N. Cholangiocarcinoma /K.N.Lazaridis, G.J. Gores// Gastroenterology. – 2005. - V.128. – P.1655-1667.
171. Li M. Hepatitis B Virus Infection Increases the Risk of Cholangiocarcinoma / M.Li, J.Li, P.Li. [et al.] // J Gastroenterol Hepatol. – 2012. – V.27. - № 10. –P.1561-1568.
172. Lim J.H. Cholangiocarcinoma: morphologic classification according to growth pattern and imaging findings/ J.H. Lim // AJR. –2003. – V.181. - № 3. – P. 819-827.
173. Liver Stem Cells and Molecular Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma/ Krit Kitisin, Michael J. Pishvaian, Lynt B. Johnson [et al.] // Cancer Res. – 2007. - V.1(4 Suppl 2). - P.13–21.
174. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Comparison of the proposed UCSF criteria with the Milan criteria and the Pittsburgh modified TNM criteria /Y. Francis, M.D. Yao, L.da Ferrell [et al.] // Liver Transplantation. - 2002. - V.8. - №9. - P. 765-774.

175. Llovet J.M. Hepatocellular carcinoma/ J.M. Llovet, A. Burroughs, J. Bruix // Lancet. - 2003. - V.362. - P. 1907–1917.

176. Localization of hepatitis B surface and core antigens in human hepatocellular carcinoma by immunoperoxidase methods. Replication of complete virions of carcinoma cells/[K. Suzuki, T. Uchida, R. Horiuchi, T. Shikata] // Cancer. – 1985. – V.56. - №2. – P.321-327.

177. Long-term survival after recurrent hepatocellular carcinoma in liver transplant patients: clinical patterns and outcome variables/ A.Kornberg, B.Küpper, A.Tannapfel [et al.]// Eur J Surg Oncol. – 2010. –V.36. – P.275–280.

178. Lugli A. Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples/ A.Lugli, L.Tornillo, M.Mirlacher [et al.] // Am J Clin Pathol. - 2004. - V.122. - P.721-727.

179. Luke C. Epidemiology of cancer of the liver and intrahepatic bile ducts in an Australian population / C. Luke, T. Price, D. Roder // Asian Pac J Cancer Prev. - 2010. - V.11. - P.1479-1485.

180. Lupberger J. Hepatitis B virus-induced oncogenesis /J.Lupberger, E.Hildt// World J. Gastroenterol. – 2007. – V.13. - №1. - P. 74-81.

181. Makoto Osanai. Expression of Carbohydrate Antigens in Pancreatic Cancer /Osanai Makoto// Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas, Molecular Genetics, Liver Carcinoma, and Pancreatic Carcinoma. – 2005. - V.3. –P.341-350.

182. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview/ C.J. Malemud // Front Biosci. - 2006. - V.11. - P. 1696-1701.

183. Maluccio M. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma / M. Maluccio, A. Covey // CA Cancer J Clin. - 2012. - V.62. - №6. - P.394-399.

184. Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm / DJ. Lennis, T.R. Hvidsten, E.C Wit [et al.] // Clin Cancer Res. – 2005. – V.11. - № 10. – P.3766-3772.

185. Masamichi Kojiro Pathology of Hepatocellular Carcinoma / Kojiro Masamichi // John Wiley & Sons. - 2009. -184p.

186. McKenna B. Pathology of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and combined hepatocellular-cholangiocarcinoma / B.McKenna, Sh.Bihlmeyer // In: Primary Carcinomas of the Liver. – Ed. Adviser J.E. Husband: Cambridge University Press.- 2010. – P.16-32.

187. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma / [Y.C. Ip, S.T.Cheung, K.L.Leung, S.T. Fan]// World J Gastroenterol. – 2005. – V.11. - № 40. – P.6269-6276.

188. Michael I. D'Angelica Resectable Hilar Cholangiocarcinoma: Surgical Treatment and Long-Term Outcome / I. D'Angelica Michael // Surg Today. – 2004. - V.34. - №11. – P.885–890.

189. Microsatellite alterations in liver fluke related cholangiocarcinoma are associated with poor prognosis / T. Limpaiboon, K. Krissadarak, B. Sripa [et al.] // Cancer Lett. - 2002. - V.181. - № 2. - P.215-222.

190. Miller R.T. Immunohistochemistry in the diagnosis of metastatic carcinoma of unknown primary origin (American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology Annual Meeting) / R.T. Miller // San Juan, Puerto Rico. - 2011. – 58 P.

191. Mocanu E. Ki-67 Expression In Hepatocellular Carcinoma Developed on a Liver Cirrhosis/ E.Mocanu, V. Broasca, B. Severin // ARS Medica Tomitana. – 2012. - V. 1. - № 68. - P.33 – 37.

192. Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features /Jau-Yu Liao, Jia-Huei Tsai, Ray-Hwang Yuan [et al.] // Modern Pathology. – 2014. – V. 27. – P.1163–1173.

193. Mounajjed T. Glypican-3 expression in gastrointestinal and pancreatic epithelial neoplasms / T.Mounajjed, L.Zhang , TT Wu // Hum Pathol. - 2013. - V.44. - P.542-550.

194. Mucin 16 (cancer antigen 125) expression in human tissues and cell lines and correlation with clinical outcome in adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, stomach, and colon / M.M.Streppel, A.Vincent, R.Mukherjee [et al.] // *Human Pathology*. – 2012. – V. 43. – P.1755–1763.

195. Multivariate and univariate analysis of prognostic factors following resection in HCC: the Birmingham experience / A.R John., S.Khan, D.F Mirza [et al.] // *Dig Surg*.- 2006. - V.23. - P.103-109.

196. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver / A. Tannapfel, L.Weinans, F. Geissler [et al.] // *Digestive Diseases and Sciences*. - 2002. - V.45. - № 2. - P.317-324.

197. Nakanuma Y. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept / Y. Nakanuma, Y. Sato, K. Harada [et al.] // *World J Hepatol*. - 2010.- V.2. – P.419–427.

198. Nakanuma Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts / Y.Nakanuma, Y. Kakuda // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. – 2015. – V.29. - №2. – P.277-293.

199. Nash J.W. The utility of estrogen receptor and progesterone receptor immunohistochemistry in the distinction of metastatic breast carcinoma from other tumors in the liver / J.W. Nash, C.Morrison, W.L. Frankel // *Arch Pathol Lab Med*. - 2003. - V.127. - № 12. - P.1591-1595.

200. Nejak-Bowen K.N. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad / K.N. Nejak-Bowen, S.P. Monga // *Semin Cancer Biol*. – 2011. – V.21. - №1. – P.44-58.

201. Nicholson D.W. Apoptosis: life and death decisions / D.W.Nicholson, N.A. Thornberry // *Science*. - 2003. - V.299. - P.214- 215.

202. Nishida N. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review / N. Nishida, A.Goel // *Curr. Genomics*. –2011. – V.12. –P. 130–137.

203. Okuda H. Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis/ H. Okuda// Res Clin Gastroenter.- 2007.- V.1. - P.161—173.
204. Orchard G. Evaluation of melanocytic neoplasms: application of a pan-melanoma antibody cocktail / G. Orchard // Br J Biomed Sci. - 2002. - V.59. - P.196-202
205. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas/ R. Persad, C. Liu, T.T. Wu [et al.] // Mod Pathol. - 2004.- V.17. - № 7. - P.861-867.
206. p53 overexpression and K-ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer /S.A. Ahrendt, A. Rashid, J.T. Chow [et al.]// J Hepatobiliary Pancreat Surg. - 2000. - V.7. - № 4. - P.426-431.
207. Patel T. Cholangiocarcinoma / T.Patel // Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. -2006. - V.3. - № 1. - P.33-42.;
208. Pathobiological implications of MUC16/CA125 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type /M Higashi, N Yamada, S Yokoyama. [et al.]// Pathobiology. – 2012. - V.79. - №2. – P.101-106.
209. Pickren J.W. Liver metastasis: analysis of autopsy data /J.W.Pickren, Y.Tsukada, W.W. Lane // In: Weiss L, Gilbert HA (eds). Liver Metastasis. GK Hall: Boston. - 1982. - P. 2-18
210. Poomphakwaen K. Risk factors for cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Thailand: a nested case-control study / K. Poomphakwaen, S.Promthet, S .Kamsa-Ard [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. - 2009. - V.10. - № 2. - P.251-258.
211. Portal vein invasion and intrahepatic micrometastasis in small hepatocellular carcinoma by gross type / Y.Nakashima, O.Nakashima, M. Tanaka [et al.] // Hepatol. Res. – 2003. – V.26. – P.142–147.
212. Prevalence of Opisthorchis viverrini infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand /S. Sriamporn, P. Pisani, V. Pipitgool [et al.] // Trop Med Int Health. - 2004. - V.9. - №5. - P.588–594.
213. Primary and Metastatic Tumours of the Liver: Expanding Scope of Morphological and Immunohistochemical Details in the Biopsy /I.Strumfa, J.

Vilmanis, A. Vanags [et al.] // In: Liver biopsy - indications, procedures, results. Ed. Nobumi Tagaya.- Rijeka, Croatia. Copyright.- © 2012 InTech. - Chapter 7. - P.115-159.

214. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends /F.X.Bosch, J.Ribes, M.Diaz [et al.] // Gastroenterology. - 2004. - V.127(5 Suppl 1). – P.5-16.

215. Prognostic Significance of E-Cadherin Expression in Hepatocellular Carcinoma/ Chen Jiang Zhao Jie, Ma Rui [et al.] // -A Meta-Analysis /PLoS One. - 2014. - V.9. -№8. - P.1-8.

216. Pusztaszeri M.P. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues /M.P.Pusztaszeri, W. Seelentag, F.T. Bosman // J Histochem Cytochem. – 2006. – V.54. -№4. – P.385-395

217. Radwan N.A. The diagnostic value of arginase-1 immunostaining in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma and cholangiocarcinoma as compared to HepPar-1 / N.A Radwan, N.S Ahmed // Diagn Pathol. – 2012. – V.7. – P.149

218. Razumilava N. Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma /N. Razumilava, G. J. Gores// Clinical Gastroenterology and Hepatology. – 2013. – V.11. – P.13–21.e1

219. Results of resection for hilar cholangiocarcinoma with analysis of prognostic factors / R. Havlik, E. Sbisà, A. Tullo [et al.] // Hepatogastroenterology. - 2000.- V.47. - № 34. - P.927-931.

220. Review to better understand the macroscopic subtypes and histogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma /Sanada Yuichi, Kawashita Yujo, Okada Satomi [et al.] // World J Gastrointest Pathophysiol. – 2014. – V.5(3). – P.188-199.

221. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? / [Y.H. Shaib, J.A.Davila, K.McGlynn, H.B. El Serag] // J Hepatol. - 2004. - V.40. – P.472-477.

222. Risk factors for hilar cholangiocarcinoma: a case-control study in China /W.K.Cai, H.Sima, B.D. Chen [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2011.- V.17. № 2. – P. 249–253.
223. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: a population-based study of U.S. veterans / H.B.El-Serag, E.A.Engels, O. Landgren [et al.] // Hepatology. - 2009. - V.49. - №1. - P.116–123
224. Rizvi S. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma / S.Rizvi, G.J. Gores // Gastroenterology. – 2013. - V.145. - № 6. – P.1215–1229.
225. Sawan A.S. The Diagnostic Value of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Primary and Secondary Hepatic Carcinomas /A.S. Sawan// JKAU: Med. Sci. - 2009. - V.16. - No.4. - P.37-48.
226. Scirrhou's type hepatocellular carcinomas: a special reference to expression of cytokeratin 7 and hepatocyte paraffin 1/ S. Matsuura, S. Aishima, K. Taguchi [et al.] // Histopathology. – 2005. – V.47. - №4. – P.382-390.
227. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C cirrhosis: a cost-utility analysis / [M.R.Arguedas, V.K.Chen, M.A.Eloubeidi, M.B. Fallon] // Am. J. Gastroenterol. – 2003. – V.98. – P. 679–690.
228. Semela D., Angiogenesis and hepatocellular carcinoma / D. Semela, J-F. Dufour // J. Hepatol. - 2004. –V.41. – P.864–880.
229. Sempoux C. Intrahepatic cholangiocarcinoma: new insights in pathology/ C. Sempoux, G.Jibara, S.C. Ward [et al.] // Seminars in Liver Disease . – 2011. – V. 31. -№1. – P.49-60.
230. Settakorn J. FAT, E-cadherin, β catenin, HER 2/neu, Ki67 immunoexpression, and histological grade in intrahepatic cholangiocarcinoma / J Settakorn N Kaewpila, G F Burns, A S-Y Leong // J Clin Pathol. -2005. - V.58. - №12. - P.1249-1254.
231. Shafizadeh N. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques / N.Shafizadeh, S.Kakar // Adv Anat Pathol. - 2011. - V.18. - P.438-445

232. Shaib Y. The epidemiology of cholangiocarcinoma / Y Shaib, HB.El-Serag // *Semin Liver Dis.* - 2004. - V.24. - P.115-125
233. Sripa B. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand/ B Sripa, C Pairojkul // *Curr Opin Gastroenterol.* - 2008. - V.24. - P.349-356
234. Singh Monga S.P. β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury And Tumorigenesis / S.P. Singh Monga // *Gastroenterology.* – 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.056
235. Slattery J.M. What is the current state of the art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma? / J.M. Slattery, D.V. Sahani // *The Oncologist.* – 2006. – V.11. - №. 8. – P.913-922.
236. Sobin L.H. International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours / L.H.Sobin, Ch.Wittekind editors // 6th ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss. - 2002.
237. Sobin L.H. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed./ Eds L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, Ch. Wittekind//. New York: Wiley_Blackwell.- 2009. - 336 p.
238. Specific characteristics of scirrhous hepatocellular carcinoma/ [T Sugiki, M. Yamamoto, K. Taka, M. Nakano] // *Hepatogastroenterology.* – 2009. – V.56, №93. – P.1086-1089.
239. Sripa B. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand/ B.Sripa, C. Pairojkul // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2008. – V.24. –P.349-356.
240. Stainer P.E. Cholangiolocellular carcinoma of the liver /P.E. Stainer, J.Hagginson // *Cancer.* - 1959. – V.12. – P.753-759.
241. Stennicke H. R. Properties of the caspases /H. R.Stennicke, G. S. Salvesen// *Biochim. Biophys. Acta.* - 1998. - V.1387. - P.17-31.
242. Structure, function and inhibition of Bcl - 2 family proteins: a new target for anti - tumor agents/ [G.Xiao, Fang H., Xing C. ,Xu W.] // *Mini Rev Med Chem.* - 2009. - V.9. - P.1596-1604.

243. Subramaniam S. A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems /S. Subramaniam, R.K. Kelley, A.P.Venook // Chin Clin Oncol. - 2013. -V.2. - № 4. – P.33-44.
244. Suriawinata A.A. Liver pathology: an atlas and concise guide /Arief A. Suriawinata, Swan N. Thung // New York: demosMEDICAL. – 2011. – 260 p.
245. Tamoxifen (TMX/Fas) induced growth inhibition of human cholangiocarcinoma by gamma interteron / S.M.Vickers, N.C.Jhala, E.Y.Ahn [et al.] //Ann Surg. - 2002. - V.235. - P.872-878.
246. Tannapfel A. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver / A. Tannapfel, L. Weinans, F.Geissler // Digestive Diseases and Sciences. - 2002. - V.45. - №2. - P.317-324.
247. The antigen for Hep Par 1 antibody is the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1 / S.L. Butler, H.Dong, D.Cardona [et al.] // Lab Invest.- 2008.- V. 88. - P.78–88.
248. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin /A.Durnez, C.Verslype, F. Nevens [et al.] // Histopathology. -2006- V.49. - №2. - P.138-151.
249. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas / V.Kaimaktchiev, L.Terracciano, L.Tornillo [et al.]// Modern Pathology. – 2004. – V.17. – P.1392–1399.
250. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective / [A.P.Venook, C.Papandreou, J.Furuse, L.L. de Guevara]// Oncologist. - 2010. – V.15. - №4. – P. 5–13.
251. The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia // Hepatology. - 2009. - V.49. - P.658-664.

252. The tumor suppressor p53: cancer and aging / [Z.Feng, W.Hu, G.Rajagopal, A.J. Levine] // Cell Cycle. – 2008. – V.7. - №7. – P.842– 847.

253. The utility of Hepatocyte Paraffin 1 antibody in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma and metastatic carcinoma/ M.S.Shiran, M.R. Isa, M.S.Sherina [et al.] // Malaysian J Pathol. -2006 - V. 28. - №2. - P. 87–92.

254. The WHO Classification of Tumours of the Digestive System (IARC WHO Classification of Tumours). 4th ed. In: / [Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D.] - editors. Publisher: World Health Organization. – 2010. – 417p.

255. Theise N.D. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in WHO classification of tumors of the digestive system; World health organization of tumors / N.D. Theise, O. Nakashima, Y.N. Park [et al.] // IARC, Lyon. - 2010. - P.225-227.

256. Tissue microarray for high-throughput analysis of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma / [K.Liu, X.Z.Lei, L.S Zhao [et al.] //World J Gastroenterology.- 2005. - V.11(9). - P.1369-1372.

257. Torbenson M. Fibrolamellar carcinoma: 2012 Update /M. Torbenson// Scientifica (Cairo). – 2012. – V. 2012. – P.743-790.

258. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets / S. Boyault, D.S.Rickman, A.de Reynies [et al.] // Hepatology. – 2007. – V.45, №1. – P.42-52.

259. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980–2004/ C. Bosetti, P. Boffetta, F. Lucchini [et al.] // Hepatology. - 2008. - V.48. - P.137–145.

260. 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.

261. Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts. 3rd series/ I K.shak, Z.Goodman, J.Stocker [et al.] // Washington, DC: AFIP. - 2001. – V.31.- 356 P.
262. Tyson G.L. Risk factors for cholangiocarcinoma/ G.L.Tyson, HB.El-Serag// Hepatology. - 2011. - V.54. - P.173-184.
263. Ultrasound guided fine needle biopsy of early hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis: a multicentre study / E.Caturelli, L.Solmi, M. Anti [et al.] // Gut. – 2004. – V.53. – P. 1356–1362.
264. Uttreshwar G.S. Hepatitis B Diagnosis Using Logical Inference and Self-Organizing Map/ G.S.Uttreshwar, A.A. Ghatol // J. Computer Science.- 2008. – V.4, № 12. - P. 1042-1050.
265. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R.Visse, H.Nagase // Circ Res. - 2003. - V.92, № 8. - P. 827-839.
266. Wang W.L. Expression and significance of HBV genes and their antigens in human primary intrahepatic cholangiocarcinoma / W.L. Wang, G.Y.Gu, M.Hu // World J. Gastroenterol. – 1998. – V.4. – P.392–396.
267. Wee A. Diagnostic utility of immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics /A.Wee // Appl Immunohistochem Mol Morphol. - 2006. - V.14. - № 3. - P.266-272.
268. Wee A. Distinction between Well-Differentiated Hepatocellular Carcinoma and Benign Hepatocellular Nodular Lesions, Using Fine-Needle Aspiration Biopsy /A. Wee // Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas, Vol.3: Molecular Genetics, Liver Carcinoma, and Pancreatic Carcinoma. – 2005. –P. 247-259.
269. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma/ Kan Zhengyan, Zheng Hancheng, Liu Xiao [et al.] // Genome Res. – 2013. –V. 23. – P.1422-1433.
270. Zhang Wang J. X. Result of p53, ki-67 protein expression in cholangiocarcinoma with in situ hybridization and immunohistochemistry

methods / J. X Wang Zhang , J. Chen // Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.
– 2000. – V.22. -№1. – P.57– 60.

271. Yang L.J. Bcl - 2, bax and their roles in tumor apoptosis / L.J.Yang, X.T
Cao., L.Z. Yu // Chin J Cancer Biother. - 2003. - V.10. - P.232-234.