УДК 616.36-006.04-07:577.112

М. Д. Зубко

Характеристика уровня экспрессии Е-кадгерина и β-катенина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: *гепатоцеллюлярная карцинома, холангиоцеллюлярная карцинома, Е-кадгерин, β-катенин.*

С целью определения уровня иммуногистохимической экспрессии Е-кадгерина и β-катенина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени разного диаметра, а также площади иммунопозитивных клеток в этих опухолях исследованы трепанобиоптаты печени 94 больных, среди которых 55 (58,51%) пациентов страдали гепатоцеллюлярным раком (ГЦР) и 39 (41,49%) – холангиоцеллюлярным раком (ХЦР) печени. С учетом размеров опухоли, определенных при ультразвуковом исследовании печени, были исследованы 21 ГЦК и 17 ХЦК диаметром до 5 см, а также 34 ГЦК и 22 ХЦК диаметром более 5 см. Экспрессию клетками Е-кадгерина определяли с помощью моноклональных антител Mo a-Hu E-Cadherin, *Clone NCH-38*, а экспрессию β-катенина – с применением моноклональных антител Mo a Hu Beta-Catenin, *Clone E247 β-Catenin-1*. Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров опухолевыми клетками и площадь иммунопозитивных опухолевых клеток определяли фотоцифровой морфометрией в программе обработки цифровых изображений ImageJ. Установлено, что у 63,64% больных ГЦР и у 100% больных ХЦР печени в злокачественных клетках определяется мембранная либо мембранно-цитоплазматическая экспрессия Е-кадгерина. Е-кадгерин иммунопозитивные клетки составляют 42,25±15,12% площади среза ткани ГЦР и 35,13±15,69% площади среза ткани ХЦР печени. В 94,55% случаев ГЦР рака и у 100% больных ХЦР печени в опухолевых клетках выявлена мембранная экспрессия β-катенина, сочетающаяся с цитоплазматической либо ядерной экспрессией этого белка. β-катенин иммунопозитивные клетки составляют 62,39±20,41% площади среза ткани ГЦР и 55,83±19,67% площади среза ткани ХЦР печени. В ГЦР и ХЦР между низким уровнем экспрессии опухолевыми клетками Е-кадгерина и высоким уровнем экспрессии β-катенина отмечена прямая сильная корреляционная связь. В крупных ГЦР и ХЦР в сравнении с меньшими опухолями диаметром до 5 см статистически достоверно меньшую площадь занимают Е-кадгерин-иммунопозитивные клетки и большую – β-катенин-иммунопозитивные клетки. Сравнение экспрессии опухолевыми клетками адгезивно-миграционных маркеров показывает, что гепатоцеллюлярный и холангиоцеллюлярный рак характеризуется ранней утратой межклеточных адгезивных связей и высокими потенциями к инвазивному росту в печени.

Характеристика рівня експресії Е-кадгерину та β-катеніну в гепатоцелюлярному та холангіоцелюлярному раку печінки

М. Д. Зубко

З метою визначення рівня імуногістохімічної експресії Е-кадгерину та β-катеніну в гепатоцелюлярному та холангіоцелюлярному раку печінки різного діаметра, а також площі імунопозитивних клітин у цих пухлинах здійснили дослідження трепанобіоптатів печінки 94 хворих, серед них 55 (58,51%) пацієнтів страждали на гепатоцелюлярний рак (ГЦР) і 39 (41,49%) – на холангіоцелюлярний рак (ХЦР) печінки. З урахуванням розмірів пухлини, що визначені при ультразвуковому дослідженні печінки, дослідили 21 ГЦК і 17 ХЦК діаметром до 5 см, а також 34 ГЦК і 22 ХЦК діаметром більш ніж 5 см. Експресію клітинами Е-кадгеринів визначали за допомогою моноклональних антитіл Mo a-Hu E -Cadherin, Clone NCH-38, а експресію β-катеніна – із застосуванням моноклональних антитіл Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 ß-Catenin-1. Рівень експресії імуногістохімічних маркерів пухлинними клітинами та площа імунопозитивних пухлинних клітин визначали за допомогою фотоцифрової морфометрії у програмі обробки цифрових зображень ImageJ. Установили, що у 63,64 % хворих на ГЦР та у 100% хворих на ХЦР печінки у злоякісних клітинах визначається мембранна або мембранно-цитоплазматична експресія Е-кадгеринів. Е-кадгерин імунопозитивні клітини становлять 42,25±15,12% площі зрізу тканини ГЦР і 35,13±15,69% площі зрізу тканини ХЦР печінки. У 94,55% випадків ГЦ раку та у 100% хворих на ХЦР печінки в пухлинних клітинах виявлена мембранна експресія β-катеніну, що поєднується з цитоплазматичною або ядерною експресією цього білка. β-катенін імунопозитивні клітини становлять 62,39±20,41% площі зрізу тканини ГЦР і 55,83±19,67% площі зрізу тканини ХЦР печінки. У ГЦР і ХЦР між низьким рівнем експресії пухлинними клітинами Е-кадгерину та високим рівнем експресії β-катеніну визначали прямий сильний кореляційний зв'язок. У великих ГЦР і ХЦР у порівнянні з меншими пухлинами діаметром до 5 см статистично вірогідно меншу площу займають Е-кадгерин-імунопозитивні клітини та велику – β-катенін-імунопозитивні клітини. Порівняння експресії пухлинними клітинами адгезивно-міграційних маркерів засвідчує: гепатоцелюлярний і холангіоцелюлярний рак характеризується ранньою втратою міжклітинних адгезивних зв'язків і високими потенціями до інвазивного росту в печінці.

Ключові слова: *гепатоцелюлярна карцинома, холангіоцелюлярна карцинома, Е-кадгерин, β-катенін.*

Патологія. – 2015. – №2 (34). – С. 64–70

Characteristics of the expression level of E-Cadherin and ß-Catenin in hepatocellular and cholangiocellular liver carcinoma

M.D. Zubko

Aim. In order to determine the level of immunohistochemical expression of E-cadherin and β-catenin in hepatocellular and cholangiocellular liver cancer of different diameters and areas of the immunopositive cells trephine biopsies of liver of 94 patients were studied, among them 55 (58,51%) had hepatocellular carcinoma (HCC) and 39 (41,49%) had cholangiocellular liver cancer (CCC).

Methods and results. Considering the size of the tumor determined by ultrasound examination of the liver 21 HCC and 17 CCC less than 5 cm in diameter, and 34 HCC and 22 CCC with diameter more than 5 cm were assayed. The expression of E-cadherin by cells

© М. Д. Зубко, 2015

was determined using a monoclonal antibody Mo-Hu E -Cadherin, Clone NCH-38, and the expression of β-catenin - using monoclonal antibodies Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E247 ß-Catenin-1. The level of expression of immunohistochemical markers of tumor cells and immunopositive tumor cells area were determined by photo digital morphometry in digital image processing program Image J. It was found that in 63,64% of patients with HCC and 100% of patients with CCC, liver cancer cells show membrane or membrane-cytoplasmic expression of E-cadherin. E-cadherin immunopositive cells make up 42,25±15,12% of area of HCC tissue section and 35,13±15,69% of area of liver tissue section of CCC. In the 94,55% of HCC cases and 100% of patients with CCC membrane expression of β-catenin, combined with a nuclear or cytoplasmic expression of the protein, was revealed in tumor cells. β-catenin immunopositive cells make up 62,39±20,41% of area of HCC tissue section and 55,83±19,67% of area of liver tissue section in CCC. In HCC and CCC, between low expression of E-cadherin by tumor cells and high levels of β-catenin a direct strong correlation is observed. In large HCC and CCC compared with smaller tumors up to 5 cm in diameter, significantly smaller space was occupied by E-cadherin-immunopositive cells and larger area was occupied by β-catenin-immunopositive cells.

Conclusion. The comparison of the expression of adhesively-migration markers by tumor cells shows that hepatocellular carcinoma and cholangiocellular cancer are characterized by early loss of intercellular adhesion bonds and high potencies to invasive growth in the liver.

Key words: *Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocellular Carcinoma, E-Cadherin, beta-Catenin.*

Pathologia. 2015; №2 (34): 64–70

Е-кадгерин и β-катенин играют важную роль в механизмах регуляции межклеточной адгезии, клеточной подвижности, миграции и пролиферации эпителиальных клеток. Е-кадгерин представляет собой кальций-зависимый трансмембранный гликопротеин, длинные внеклеточные участки которого формируют на поверхности клеток параллельные димеры, которые взаимодействуют с молекулами Е-кадгерина соседних эпителиальных клеток и образуют межклеточные контакты типа «адгезионных поясков сцепления» (zonula adherens). В зоне адгезионного пояска цитоплазматический домен Е-кадгерина взаимодействует с цитоплазматическими белками (β и γ катенинами), которые с участием α-катенина прикрепляют к внутренней мембране плазмолеммы контактирующих клеток актиновые микрофиламенты. Таким образом, кадгерины объединяют актиновые цитоскелеты клеток и одновременно обеспечивают стабильную межклеточную адгезию [1], а β-катенин обеспечивает связь Е-кадгерина с актиновыми микрофиламентами и участвует в регуляции реорганизации цитоскелета клетки. В покоящейся клетке содержание свободного (нефосфорилированного) β-катенина лимитировано связыванием с кадгерином и последующим фосфорилированием субмембранной тирозинкиназой и киназой гликогенсинтазы 3 β, а также его деградацией, опосредованной геном APC (аденоматозного полипоза кишечника).

Снижение экспрессии на клеточной поверхности Е-кадгерина ведет к накоплению в клетке нефосфорилированного β-катенина, что в свою очередь приводит к регуляторным сдвигам пролиферации и миграции эпителиальных клеток, а также к усилению пролиферации, миграции и инвазивности раковых клеток. Нефосфорилированный β-катенин перемещается в ядро, взаимодействует с ядерным фактором транскрипции TCF/LEF-1 и образует комплекс β-катенин – TCF, который через промоторный участок гена циклина D_1 активирует транскрипцию этого гена и пролиферацию клетки. Одновременно LEF-1 воздействует на ген кадгерина Е, вызывая его супрессию, в результате чего снижается синтез кадгерина Е и ослабляется межклеточная адгезия, что способствует повышению миграции и инвазивности опухолевых клеток [2,3]. Сегодня актуальным является поиск прогностических маркеров развития ГЦР и ХЦР, среди которых большое значение имеют молекулы клеточной адгезии, уровень экспрессии которых значительно изменяется в злокачественных опухолях. Jiang Chen et al. [4] рассматривают Е-кадгерин и β-катенин в качестве потенциальных прогностических маркеров течения первичного рака печени. Подавление экспрессии Е-кадгерина описано в ГЦР на поздних стадиях его развития, при инвазии и неблагоприятном прогнозе опухоли [5], а накопление β-катенина в опухолевых клетках обнаружено на ранней стадии ГЦР [6,7]. Показано, что снижение экспрессии Е-кадгерина ассоциировано со снижением адгезии и подвижности клеток ХЦР, с ускорением канцерогенеза, а также с повышением инвазивности опухоли и ее плохим прогнозом [4,8].

Восстановление экспрессии Е-кадгерина в раковых клетках с помощью введения генно-инженерных конструкций вызывает резкое замедление пролиферации и переход от инвазивного к неинвазивному фенотипу. Причем рост-супрессирующий эффект Е-кадгерина обусловливается его способностью связывать и секвестрировать β-катенин и не зависит от того, происходит ли при этом восстановление межклеточных контактов [2].

Работы по экспрессии Е-кадгерина и β-катенина в ГЦ и ХЦ раке печени пока малочисленны и противоречивы.

Цель работы

Определение уровней экспрессии Е-кадгерина и β-катенина, а также площади иммунопозитивных клеток в холангиоцеллюлярном и гепатоцеллюлярном раке печени разного диаметра.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследования трепанобиоптатов печени 94 больных, среди которых 55 (58,51%) страдали ГЦК и 39 (41,49%) – ХЦК печени. Средний возраст больных ГЦК составил 61,94±12,16 года (26–81год), ХЦК – 58,46±11,52 года (33–83 года). С учетом размеров опухоли, определенных при ультразвуковом исследовании печени, выделены больные с опухолью небольших размеров (диаметром до 5 см) и больные с единичными либо множественными узлами рака печени более 5 см в диаметре. Таким образом, исследованы 21 ГЦК и 17 ХЦК диаметром до 5 см, а также

34 ГЦК и 22 ХЦК диаметром более 5 см. В контрольной группе исследовали биоптаты печени 5 умерших от соматических заболеваний без клинико-биохимических и морфологических признаков поражения печени.

Столбики трепанобиоптатов печени больных ГЦК и ХЦК фиксировали в забуференном 10% формалине и заливали в парафин. На ротационном микротоме HM-3600 (MICROM Laborgerate GmbH, ФРГ) изготавливали серийные срезы толщиной 3–4 мкм для их окраски гематоксилином и эозином по ван Гизону и Массон-триколор, а также для ИГХ исследований.

В соответствии со стандартизованными протоколами в парафиновых срезах ткани печени после температурного демаскирования антигенов и подавления активности эндогенной пероксидазы проводились ИГХ исследования с использованием соответствующих первичных антител и системы визуализации DAKO EnVision+ System («DAKO», Дания) с диаминобензидином (DAB). Экспрессию клетками Е-кадгерина определяли с помощью моноклональных антител Mo a-Hu E-Cadherin, *Clone NCH-38* (DAKO, США), а экспрессию β-катенина – с применением моноклональных антител Mo a Hu Beta-Catenin, *Clone E247 β-Catenin-1*(DAKO, США). Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров опухолевыми клетками и площадь иммунопозитивных опухолевых клеток определяли фотоцифровой морфометрией. Для количественной оценки уровня экспрессии Е-кадгерина и β-катенина в каждом наблюдении рака печени микропрепараты с соответствующей иммунопозитивной реакцией фотографировали цифровой фотокамерой «Olympus 3040» (Япония) в микроскопе Axioplan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении x200 в 5 полях зрения и анализировали с использованием медицинской программы обработки цифровых изображений ImageJ [9]. В плагине Colour Deconvolution этой программы во встроенной схеме анализа «гематоксилин+DAB» по уровню DAB-окрашивания определяли уровень экспрессии соответствующих иммуногистохимических маркеров. Интенсивность экспрессии изучаемых маркеров градуировали количественно в условных единицах оптической плотности (УЕОП) от 0 – белый до 255 – чёрный и разбивали на 4 категории: негативная реакция – 0–20 УЕОП; низкий уровень экспрессии – 21–50 УЕОП; умеренный уровень экспрессии – 51–100 УЕОП; высокий уровень экспрессии – более 100 УЕОП.

Для морфометрического измерения площади, занимаемой β-катенин и Е-кадгерин-иммунопозитивными клетками в цифровых иммуногистохимических изображениях гепато- и холангиоцеллюлярного рака печени, с использованием программы ImageJ определяли суммарную площадь экспрессии каждого перечисленного маркера, которая представляла собой процентное соотношение числа пикселей иммунопозитивного цифрового изображения соответствующего маркера к общему числу пикселей в изображении, выраженному в %.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере в программе «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли среднее значение (M), среднее квадратическое отклонение (σ), стандартную ошибку репрезентативности среднего значения (m), рассчитывали 95% доверительный интервал среднего значения. Корреляционную связь определяли с расчетом коэффициента Пирсона (для непараметрических данных). Результаты считали достоверными при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведённые нами исследования показали, что в ткани здоровой печени пациентов контрольной группы мембранная экспрессия Е-кадгерина наблюдалась в 100% гепатоцитов, Е-кадгерин-иммунопозитивными были также все клетки, выстилающие желчевыводящие протоки печени. Уровень мембранной экспрессии Е-кадгерина в гепатоцитах колебался от высокого (156,23±33,15 УЕОП) до умеренного (67,21±15,29 УЕОП), уровень мембранной экспрессии Е-кадгерина в билиарном эпителии также колебался от высокого (134,15±29,37 УЕОП) до умеренного (69,23±19,83 УЕОП). У пациентов контрольной группы в нормальной ткани печени во всех гепатоцитах печени наблюдался высокий (147,51±28,73 УЕОП) уровень цитоплазматически-мембранной экспрессии β-катенина, а также высокий (133,19±30,21 УЕОП) уровень цитоплазматически-мембранной экспрессии этого белка во всех эпителиальных клетках желчевыводящих протоков.

При иммуногистохимическом анализе экспрессии Е-кадгерина клетками ГЦР получили результаты: у 36,36% больных экспрессия Е-кадгерина в опухолевых гепатоцитах ГЦР не выявлялась. Из 63,64% больных с Е-кадгерин-иммунопозитивным ГЦР мембранная экспрессия Е-кадгерина клетками ГЦР определялась у 27,28% пациентов, а мембранно-цитоплазматическая экспрессия Е-кадгерина клетками ГЦР – у 36,36% больных. Высокий (145,7±43,15УЕОП) и умеренный (77,5±13,39 УЕОП) уровень экспрессии Е-кадгерина клетками ГЦР был установлен у одинакового числа (18,18%) больных, низкий уровень экспрессии этого гликопротеина (27,22±6,15 УЕОП) определялся у 27,28% больных ГЦР. Е-кадгерин-иммунопозитивные клетки занимали в среднем 42,25±15,12% площади ГЦР, что значительно меньше площади Е-кадгерин-иммунопозитивных гепатоцитов в нормальной ткани печени. По данным Jiang Chen et al. [4], снижение экспрессии Е-кадгерина наблюдается в 20–60% случаев ГЦР и может быть связано с разной степенью гистологической дифференцировки опухоли.

При анализе экспрессии β-катенина установили, что у 94,55% больных в клетках ГЦР выявлялась экспрессия этого белка, у 5,45% больных отсутствовала экспрессия β-катенина в клетках ГЦР. Из всех пациентов, имевших β-катенин-иммунопозитивную ГЦР, у 21,82% больных определялась одновременная мембранная, цитоплазматическая и ядерная экспрессия β-катенина в клетках опухоли, у 50,91% пациентов установлена мембранная и

цитоплазматическая экспрессия этого маркера в злокачественных гепатоцитах, у 21,82% больных определялась только мембранная экспрессия β-катенина в клетках ГЦР. Высокий уровень экспрессии β-катенина клетками ГЦР, составлявший 156,58±39,21 УЕОП, установлен у 52,73% больных, умеренный уровень экспрессии β-катенина в ГЦР (69,53±18,54 УЕОП) – у 30,91%, низкий уровень экспрессии этого белка (39,33±8,91УЕОП) – у 10,91% больных. При фотоцифровой морфометрии установлено: площадь, занимаемая β-катенин-иммунопозитивными клетками, составляла в среднем 62,39±20,41% площади гепатоцеллюлярного рака, что значительно больше площади занимаемой Е-кадгерин-иммунопозитивными клетками. В тоже время у 36,36 % больных с отрицательной экспрессией Е-кадгерина определялся высокий либо умеренный уровень β-катенина. Между низким уровнем экспрессии Е-кадгерина клетками ГЦР и высоким уровнем экспрессии β-катенина отмечена прямая сильная связь (коэффициент Пирсона r=0,78) (*табл. 1*).

Singh Monga S.P. [2015] [10] приводит анализ литературных данных о том, что изменение активности β-катенина, мутации гена CTNNB1 и нарушение WNT-β-катенин сигнального пути наблюдаются у 8–44% больных ГЦР. Данные специализированной литературы о прогностическом значении мутаций CTNNB1 пока противоречивы, они ассоциировались как с лучшим прогнозом и более дифференцированным типом ГЦР [11], так и с более пролиферирующим и плохо дифференцированным типом ГЦР [12,13]. Однако аномальные активации WNT-β-катенин сигнального пути обнаруживаются в большинстве ГЦК [14].

Согласно результатам иммуногистохимического исследования Jiang Chen et al. [4] и Peifeng Li et al. [15], аномальная цитоплазматическая и/или ядерная экспрессия β-катенина обнаруживается в 17–40% ГЦР и является независимым прогностическим фактором, ассоциированным с плохим прогнозом и увеличением инвазивного потенциала ГЦР. В своих исследованиях Liem Thanh Tien et al. [16] выявили положительную мембранную экспрессию β-катенина, ассоциированную с его цитоплазматической или ядерной экспрессией в злокачественных клетках 78% ГЦР. Локализация экспрессии β-катенина по их наблюдениям зависела от степени дифференцировки опухоли: в хорошо и умеренно дифференцированном ГЦР экспрессия β-катенина выявлялась на мембране и в цитоплазме клеток. В то же время S.H.Bae et al. [17] выявили положительную экспрессию β-катенина в 97% случаев ГЦР печени. Цитоплазматическую экспрессию β-катенина они наблюдали в 83% ГЦР и ядерную экспрессию – в 14% печёночно-клеточного рака. Ядерная экспрессия β-катенина выявлялась только в умеренно и слабо дифференцированных гепатоцеллюлярных карциномах.

При иммуногистохимическом анализе экспрессии адгезивно-миграционных маркеров в ХЦР печени нами получены такие результаты. Экспрессия Е-кадгерина опухолевыми клетками ХЦР отмечена у всех больных. Высокий уровень (123,17±15,99 УЕОП) экспрессии Е-кадгерина клетками ХЦР печени выявлен у 43,59 % больных, из которых у 58,97% отмечен высокий уровень мембранной экспрессии этого гликопротеина, а у 41,03% больных – высокий уровень мембранно-цитоплазматической экспрессии Е-кадгерина. Умеренный уровень экспрессии (73,25±15,12 УЕОП) Е-кадгерина клетками ХЦР печени определён у 30,77% пациентов, низкий уровень экспрессии Е-кадгерина (35,45±9,32 УЕОП) выявлен у 25,64% больных. Площадь Е-кадгерин-иммунопозитивных клеток составила 35,13±15,69% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

Во всех изученных нами случаях ХЦР выявлена экспрессия β-катенина злокачественными опухолевыми клетками. В большинстве наблюдений (62,5% больных) определялась мембранная и цитоплазматическая экспрессия β-катенина, у 31,25% больных установили только мембранную экспрессия этого белка и у 6,25% пациентов – мембранную, цитоплазматическую и ядерную экспрессии β-катенина. Высокий уровень экспрессии β-катенина, составляющий 143,91±33,52 УЕОП, выявлен у 56,25% больных ХЦР печени, умеренный уровень экспрессии β-катенина (67,42±16,39 УЕОП) клетками ХЦР наблюдался у 31,25% пациентов, низкий уровень экспрессии β-катенина (39,74±8,12 УЕОП) – у 12,5% больных. При фотоцифровой морфометрии установлено, что β-катенина-иммунопозитивные опухолевые клетки занимали в среднем 55,83±19,67% площади холангиоцеллюлярного рака. Между низким уровнем экспрессии Е-кадгерина клетками ХЦР и высоким уровнем экспрессии β-катенина клетками ХЦР отмечена прямая сильная связь (коэффициент Пирсона r=0,99) (*табл. 2*).

Таким образом, отрицательной экспрессии Е-кадгерина и β-катенина клетками холангиоцеллюлярного рака печени не установлено. Аналогичные результаты получили J. Settakorn et al. [18], выявившие цитоплазматическую экспрессию Е-кадгерина и β-катенина в 100% наблюдений ХЦР. Позитивная мембранная экспрессия Е-кадгерина и β-катенина была обнаружена ими в 37,8% и 41,94% наблюдений соответственно, в 16,13% наблюдений установлена ядерная экспрессия β-катенина

Таблица 1

Характеристика экспрессии Е-кадгерина и β-катенина клетками гепатоцеллюлярного рака печени

Тип адгезивно-миграционных маркеров	Уровни экспрессии в УЕОП			Площадь иммунопозитивных клеток в опухоли (M±m)
	Высокий (M±m)	Умеренный (M±m)	Низкий (M±m)	
Е-кадгерин	145,7±43,15	77,5±13,39	27,22±6,15*	42,25±5,12%
β-катенин	156,58±39,21*	69,53±18,54	39,33±8,91	62,39±20,41%
Коэффициент корреляции Пирсона r	+0,78			

Примечание: * – между какими уровнями экспрессии Е-кадгерина и β-катенина проводился корреляционный анализ.

Таблица 2

Характеристика экспрессии Е-кадгерина и β-катенина клетками холангиоцеллюлярного рака печени

Тип адгезивно-миграционных маркеров	Уровни экспрессии в УЕОП			Площадь иммунопозитивных клеток в опухоли (M±m)
	Высокий (M±m)	Умеренный (M±m)	Низкий (M±m)	
Е-кадгерин	123,17±15,99	73,25±15,12	35,45±9,32*	35,13±15,69
β-катенин	143,91±33,52*	67,42±16,39	39,74±8,12	55,83±19,67
Коэффициент корреляции Пирсона r	0,99			

Примечание: * – между какими уровнями экспрессии Е-кадгерина и β-катенина проводился корреляционный анализ.

клетками ХЦР.

Исследования показали, что площадь Е-кадгерин- и β-катенин-иммунопозитивных клеток в ГЦР и в ХЦР напрямую зависела от размера опухоли: чем больше была опухоль, тем в ней меньшую площадь занимали Е-кадгерин-иммунопозитивные клетки и тем большую площадь в ней занимали β-катенин-иммунопозитивные клетки. Площадь Е-кадгерин-иммунопозитивных клеток в ГЦР диаметром менее 5 см статистически достоверно более чем в 1,8 раза меньше, чем в ГЦР диаметром более 5 см, а площадь Е-кадгерин-иммунопозитивных клеток в ХЦР диаметром менее 5 см статистически достоверно более чем в 2 раза меньше, чем в ХЦР диаметром больше 5 см (*табл. 3*). Площадь β-катенин-иммунопозитивных клеток в ГЦР диаметром более 5 см статистически достоверно почти в 1,8 раза больше, чем в ГЦР диаметром менее 5 см, а площадь β-катенин-иммунопозитивных клеток в ХЦР диаметром более 5 см статистически достоверно почти в 1,7 раз больше, чем в ХЦР диаметром менее 5 см (*табл. 3*).

В соответствии с полученными результатами, уменьшение площади экспрессии Е-кадгерина при одновременном увеличении площади β-катенин-позитивных клеток в ГЦР и в ХЦР размерами более 5см свидетельствует о снижении в них межклеточных адгезионных связей и о возрастании инвазивных свойств опухолевых клеток.

Анализ экспрессии опухолевыми клетками адгезивно-миграционных маркеров (*табл. 4*) показал, что клетки гепатоцеллюлярного и холангиоцеллюлярного рака печени характеризуются утратой экспрессии Е-кадгерина и ростом аномальной ядерной и цитоплазматической экспрессии β-катенина в сравнении с гепатоцитами и билиарным эпителием нормальной ткани печени.

В гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциноме между высоким и умеренным уровнем экспрессии опухолевыми клетками β-катенина, умеренным и низким Е-кадгерина отмечается прямая сильная связь (коэффициент корреляции Пирсона r=+0,78 и r=+0,99 соответственно).

В крупных ГЦР и ХЦР в сравнении с меньшими опухолями диаметром до 5 см статистически достоверно меньшую площадь занимают Е-кадгерин-иммунопозитивные клетки и большую – β-катенин-иммунопозитивные клетки, что свидетельствует о снижении клеточной адгезии и о увеличении инвазивного потенциала злокачественных клеток по мере увеличения размеров этих опухолей печени.

Таблица 3

Характеристика экспрессии β-катенина и Е-кадгерина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени разного диаметра, (M±m)

Основные параметры экспрессии адгезивно-миграционных маркеров в опухоли	Площадь Е-кадгерин иммунопозитивных клеток в опухоли (M±m)	Площадь β-катенин иммунопозитивных клеток в опухоли (M±m)
Гепатоцеллюлярный рак печени d до 5 см (A)	53,22±5,75	40,29±11,21
Гепатоцеллюлярный рак печени d более 5 см (B)	28,18±1,12*	70,19±9,97*
Холангиоцеллюлярный рак печени d до 5 см (C)	45,28±5,25	63,95±12,91
Холангиоцеллюлярный рак печени d более 5 см (D)	20,12±2,12#	38,24±3,89#

Примечания: * – достоверная разница (p<0,05) в сравнении с A; # – достоверная разница (p<0,05) в сравнении с C.

Таблица 4

Основные параметры экспрессии Е-кадгерина и β-катенина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени

Основные параметры экспрессии адгезивно-миграционных маркеров в опухоли	Гепатоцеллюлярный рак печени		Холангиоцеллюлярный рак печени	
	Е-кадгерин	β-катенин	Е-кадгерина	β-катенин
Процент больных с экспрессией ферментов в опухоли	63,64%	94,55%	100%	100%
Площадь иммунопозитивных клеток в опухоли	42,25±15,12%	62,39±20,41%	35,13±15,69%	55,83±19,67%
Процент больных с высоким уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	18,18%	52,73%	43,59 %	56,25%
Процент больных с умеренным уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	18,18%	30,91%	30,77%	31,25%
Процент больных с низким уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	27,28%	10,91 %	25,64%	12,5%

Выводы

1. У 63,64% больных гепатоцеллюлярным раком и у 100% больных холангиоцеллюлярным раком печени в злокачественных клетках определена мембранная либо мембранно-цитоплазматическая экспрессия Е-кадгерина. Е-кадгерин иммунопозитивные клетки составляли 42,25±15,12% площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака и 35,13±15,69% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

2. В 94,55% случаев гепатоцеллюлярного рака и у 100% больных холангиоцеллюлярным раком печени в опухолевых клетках установлена мембранная экспрессия β-катенина, сочетающаяся с цитоплазматической либо ядерной экспрессией этого белка. β-катенин иммунопозитивные клетки составляют 62,39±20,41% площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака печени и 55,83±19,67% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

3. В гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке между низким уровнем экспрессии опухолевыми клетками Е-кадгерина и высоким уровнем экспрессии β-катенина установлена прямая сильная связь (коэффициент корреляции Пирсона r=+0,78 и r=+0,99 соответственно).

4. В крупных ГЦР и ХЦР в сравнении с меньшими опухолями диаметром до 5 см статистически достоверно меньшую площадь занимают Е-кадгерин-иммунопозитивные клетки и большую площадь занимают β-катенин-иммунопозитивные клетки, что свидетельствует о снижении клеточной адгезии и о увеличении инвазивного потенциала злокачественных клеток по мере увеличения размеров этих опухолей печени.

Заключение. Гепатоцеллюлярный и холангиоцеллюлярный рак характеризуются ранней утратой межклеточных адгезивных связей и высокими потенциями к инвазивному росту в печени.

Список литературы

1. Молекули адгезії та їх значення при розвитку злоякісних пухлин / Л.З. Поліщук, О.Д. Рябцева, Н.Ю. Лук'янова, В.Ф. Чехун // Онкология. – 2011. – Т. 13. – №1. – С. 4–10.
2. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены / Б.П. Копнин // Канцерогенез / [под ред. Д.Г. Заридзе]. – М. : Медицина, 2004. – С. 125–157.
3. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer / E. Van Aken, O. De Wever, A.S. Correia da Rocha, M. Mareel // Virchows Arch. – 2001. – Vol. 439(6). –P. 725–751.
4. Prognostic Significance of E-Cadherin Expression in Hepatocellular Carcinoma / Jiang Chen, Jie Zhao, Rui Ma et al. // A Meta-Analysis /PLoS One. – 2014. – Vol. 9(8). –P. 1–8.
5. Лазаревич Н.Л. Молекулярные механизмы прогрессии опухолей печени / Н.Л. Лазаревич // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 365–418.
6. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process / T. Suzuki, H. Yano, Y. Nakashima et al. // M.J Gastroenterol Hepatol. – 2002. – Vol. 17(9). – P. 994–1000.
7. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Haras gene mutations / N. Harada, H. Oshima, M. Katoh et al. // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64(1). – P. 48–54.
8. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis / Hayato Nakagawaa, Yohko Hikibac, Yoshihiro Hirataa et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – Vol. 111(3). – P. 1090–1095.
9. Rasband W.S. Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland / W.S. Rasband. Access mode: U. S. USA – http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012.
10. Singh Monga S.P. β-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury And Tumorigenesis / S.P. Singh Monga // Gastroenterology. – 2015. – 5 Mar.
11. Transcriptome classification ofHCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets / S. Boyault, D.S. Rickman, A. de Reynies et al. // Hepatology. – 2007. – Vol. 45(1). – P. 42–52.
12. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process / T. Suzuki, H. Yano, Y. Nakashima et al. // J Gastroenterol Hepatol. – 2002. – Vol. 17(9). – P. 994–1000.
13. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma / Y. Hoshida, S.M. Nijman, M. Kobayashi et al. // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69(18). – P. 7385–7392.
14. 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. – Vol. 21(1). – P. 44–58.
15. Expression of Wnt-5a and β-catenin in primary hepatocellular carcinoma / Peifeng Li., Yongcheng Cao, Yamin Li et al. // Int J Clin Exp Pathol. – 2014. – Vol. 7(6). – P. 3190–3195.
16. Expression of β-catenin in hepatocellular carcinoma / L.T. Tien, M. Ito, M. Nakao et al. // World J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11(16). –P. 2398–2401.
17. 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. – Vol. 8(3). – P. 297–303.
18. 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. – Vol. 58. – P. 1249–1254.

References

1. Polishchuk, L. Z., Riabtseva, O. D., Luk'ianova, N. Yu., & Chekhun, V. F. (2011) Molekuly adhezii ta yikh znachennia pry rozvytku zloiakisnykh pukhlyn [Adhesion molecules and their importance in the development of malignant tumors]. *Onkolohiia*, 13(1), 4–10. [in Ukrainian].
2. Kopnin, B. P. (2004) Opukholevye supressory i mutatornye geny [Tumor suppressor genes and the mutator]. *Kancerogenez,* (ed. D.G. Zaridze), (p. 125–157). Moscov: Medicina. [in Russian].
3. Van Aken, E., De Wever, O., Correia da Rocha, A. S., Mareel, M (2001) Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch*., 439(6), 725–751. doi: 10.1007/s004280100516.
4. Jiang Chen, Jie Zhao, Rui Ma, Hui Lin, Xiao Liang, & Xiujun Cai (2014) Prognostic Significance of E-Cadherin Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*., 9(8), e103952. doi: 10.1371/journal.pone.0103952.
5. Lazarevich, N. L. (2004) Molekulyarnye mekhanizmy progressii opukholej pecheni [Molecular mechanisms of the progression of liver tumors]. *Uspekhi biologicheskoj khimii*, 44, 365–418. [in Russian].
6. Suzuki, T, Yano, H., Nakashima, Y., Nakashima, O., Kojiro, M. (2002) Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *M. J Gastroenterol Hepatol*, 17(9), 994–1000.

doi: 10.1046/j.1440-1746.2002.02774.x.
7. Harada, N., Oshima, H., Katoh, M., Tamai, Y., Oshima, M., & Taketo, M. M. (2004) Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Haras gene mutations. *Cancer Res,* 64(1), 48–54.
8. Nakagawa, H., Hikiba, Y., Hirata, Y., Font-Burgada, J., Sakamoto, K., Hayakawa, Y. (2014) Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 111(3), 1090–1095. doi: 10.1073/pnas.1322731111.
9. Rasband, W. S. (1997–2012) Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Retrieved from http://imagej.nih.gov/ij/.
10. Singh Monga, S. P. (2015) β-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury And Tumorigenesis. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.056.
11. Boyault, S., Rickman, D. S., de Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., et al. (2007) Transcriptome classification ofHCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42–52. doi: 10.1002/hep.21467.
12. Suzuki, T., Yano, H., Nakashima, Y., Nakashima, O., & Kojiro, M. (2002) Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol*, 17(9), 994–1000. doi: 10.1046/j.1440-1746.2002.02774.x.
13. Hoshida, Y., Nijman, S. M., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J. P., Chiang, D. Y., et al. (2009) Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 69(18), 7385–7392. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1089.
14. Nejak-Bowen, K. N. & Monga, S. P. (2011) Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol.*, 21(1), 44–58. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.12.010.
15. Peifeng, Li, Yongcheng, Cao, Yamin, Li, Luting, Zhou, Xiaohong, Liu, Ming, Geng (2014) Expression of Wnt-5a and β-catenin in primary hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(6), 3190–3195.
16. Tien, L. T., Ito, M., Nakao, M., Niino, D., Serik, M., Nakashima, M., et al. (2005) Expression of β-catenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 11(16), 2398–2401.
17. Bae, S. H., Jung, E. S., Park, Y. M., Jang, J. W., Choi, J. Y., Cho, S. H., et al. (2002) Expression patterns of E-cadherin and beta-catenin according to clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *Taehan Kan Hakhoe Chi*., 8(3), 297–303.
18. Settakorn, J., Kaewpila, N., Burns, G. F., & Leong, A S-Y. (2005) FAT, E-cadherin, β catenin, HER 2/neu, Ki67 immunoexpression, and histological grade in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Clin Pathol*., 58, 1249–1254. doi:10.1136/jcp.2005.026575.

Сведения об авторе:
Зубко М.Д., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет,
E-mail: zubko_md@mail.ru.
Відомості про автора:
Зубко М.Д., асистент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет,
E-mail: zubko_md@mail.ru.
Information about author:
Zubko M.D., Assistant of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University,
E-mail: zubko_md@mail.ru.

Надійшла в редакцію 06.05.2015 р.