

В. А. Туманский, М. Д. Зубко

Характеристика уровня экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, холангиоцеллюлярная карцинома, TIMP-1, MMP-9.

С целью определения уровня иммуногистохимической экспрессии MMP-9 и ее тканевого ингибитора TIMP-1, а также площади иммунопозитивных клеток в холангиоцеллюлярном и гепатоцеллюлярном раке печени проведено патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов печени 94 больных, среди которых 55 (58,51%) пациентов страдали гепатоцеллюлярным раком печени, 39 (41,49%) – холангиоцеллюлярным раком печени. Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров опухолевыми клетками и площадь иммунопозитивных клеток в опухоли определяли фотоцифровой морфометрией. Установлено, что у 92,73% больных гепатоцеллюлярной карциномой и у 89,74% больных холангиоцеллюлярной карциномой в злокачественных клетках определялась цитоплазматическая экспрессия MMP-9. MMP-9-иммунопозитивные клетки составляли $59,33 \pm 22,57\%$ площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака и $52,71 \pm 20,86\%$ площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени. У 80% больных в гепатоцеллюлярной карциноме и у 74,36% в холангиоцеллюлярной карциноме в опухолевых клетках установлена цитоплазматическая экспрессия TIMP-1. TIMP-1-иммунопозитивные клетки составляли $21,94 \pm 6,27\%$ площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака печени и $33,05 \pm 13,85\%$ площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени. В обоих типах рака печени между высоким уровнем экспрессии опухолевыми клетками MMP-9 и низким уровнем экспрессии TIMP-1 отмечена прямая сильная корреляционная связь, что свидетельствует о высоком потенциале инвазивности и агрессивности гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциномы.

Характеристика рівня експресії MMP-9 і TIMP-1 у гепатоцелюлярному та холангіоцелюлярному раку печінки

В. О. Туманський, М. Д. Зубко

З метою визначення рівня імуногістохімічної експресії MMP-9 та її тканинного інгібітора TIMP-1, а також площі імунопозитивних клітин у холангіоцелюлярному й гепатоцелюлярному раку печінки здійснили патогістологічне, гістохімічне й імуногістохімічне дослідження трепанобіоптатів печінки 94 хворих, серед них 55 (58,51%) пацієнтів страждали на гепатоцелюлярний рак печінки, 39 (41,49%) – на холангіоцелюлярний рак печінки. Рівень експресії імуногістохімічних маркерів пухлинними клітинами та площу імунопозитивних клітин у пухлині визначали фотоцифровою морфометрією. Встановили, що у 92,73% хворих на гепатоцелюлярну карциному та у 89,74% хворих на холангіоцелюлярну карциному у злоякісних клітинах визначалася цитоплазматична експресія MMP-9. MMP-9-імунопозитивні клітини становили $59,33 \pm 22,57\%$ площі зрізу тканини гепатоцелюлярного раку та $52,71 \pm 20,86\%$ площі зрізу тканини холангіоцелюлярного раку печінки. У 80% хворих у гепатоцелюлярній карциномі та у 74,36% в холангіоцелюлярній карциномі в пухлинних клітинах виявили цитоплазматичну експресію TIMP-1. TIMP-1-імунопозитивні клітини становили $21,94 \pm 6,27\%$ площі зрізу тканини гепатоцелюлярного раку печінки та $33,05 \pm 13,85\%$ площі зрізу тканини холангіоцелюлярного раку печінки. В обох типах раку печінки між високим рівнем експресії пухлинними клітинами MMP-9 і низьким рівнем експресії TIMP-1 визначили прямий сильний кореляційний зв'язок, що свідчить про високий потенціал інвазивності й агресивності гепатоцелюлярної та холангіоцелюлярної карциноми.

Ключові слова: гепатоцелюлярна карцинома, холангіоцелюлярна карцинома, TIMP-1, MMP-9.**Патологія.** – 2015. – №1 (33). – С. 20–25

Characteristics of the expression level of MMP-9 and TIMP-1 in hepatocellular and cholangiocellular liver carcinoma

V. A. Tumanskiy, M. D. Zubko

Aim. In order to determine the expression level of immunohistochemical markers of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its tissue inhibitor TIMP-1, and area of immunopositive cells a comprehensive histopathological, histological and immunohistochemical study of liver biopsy specimens was carried out in 94 patients, of which 55 (58.51%) patients had hepatocellular carcinoma and 39 (41.49%) – cholangiocellular carcinoma of liver.

Methods and results. In 92.73% of patients with hepatocellular carcinoma and in 89.74% of patients with cholangiocellular carcinoma in malignant cells cytoplasmic expression of MMP-9 was determined. MMP-9 immunopositive cells took $59,33 \pm 22,57\%$ of area of the tissue section of hepatocellular carcinoma and $52,71 \pm 20,86\%$ of area of the tissue section of cholangiocellular liver cancer. In 80% of hepatocellular carcinoma patients and 74.36% of patients with cholangiocellular carcinoma in tumor cells cytoplasmic expression of TIMP-1 was revealed. TIMP-1 immunopositive cells constituted $21,94 \pm 6,27\%$ of area of the tissue section of hepatocellular liver cancer and $33,05 \pm 13,85\%$ of area of the tissue section of holangiocellular liver cancer.

Conclusion. In both types of liver cancer direct strong relationship was noted between high levels of expression of MMP-9 by the tumor cells and low expression of TIMP-1, which indicates high invasive potential and aggressiveness of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocellular Carcinoma, Mouse TIMP-1 Protein, Mouse MMP-9 Protein.**Pathologia.** 2015; №1 (33): 20–25

Семейство матриксных металлопротеиназ (ММР) представляет собой более чем 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать внеклеточный фибриллярно-молекулярный матрикс и базальные мембраны, активность которых регулируется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИМР) [1]. В зависимости от структурно-функциональных особенностей и субстратной специфичности ММР выделяют несколько их подсемейств: коллагеназы широкого спектра действия (ММР-1, 8, 13), желатиназы, или специфические коллагеназы коллагена IV типа (ММР-2 и 9), стромелизины (ММР-3 и 10), матрилизины (ММР-7, ММР-26) и ММР мембранного типа [2]. Известно несколько механизмов регуляции активности ММР в тканях, которые работают на различных уровнях, в том числе на уровне транскрипции генов клеток-продуцентов ММР, на уровне активации ММР-проферментов и торможения тканевыми ингибиторами активных металлопротеиназ. Подавляющий механизм ТИМР заключается в том, что они в эквимолярном соотношении связываются с каталитическим сайтом активного фермента ММР, препятствуя его активности, а также с карбоксильным концом ММР-профермента, предотвращая его активацию [3]. Таким образом, взаимодействия ММР и ТИМР играют важную роль в поддержании баланса внеклеточного волокнисто-молекулярного матрикса органов.

В последнее десятилетие появились публикации о наличии экспрессии ММР и ТИМР клетками гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и холангиоцеллюлярной карциномы (ХЦК) печени [3,4]. Учитывая физиологические функции ММР, экспрессию этих ферментов в опухоли ассоциировали с инвазивным ростом опухолевых клеток в окружающую ткань, с их внедрением в сосуды и с метастазированием гепатоцеллюлярного рака [5–7], а также холангиоцеллюлярного рака печени [8,9]. Тем не менее, значение разных уровней экспрессии этих ферментов клетками опухоли и окружающей ткани изучено недостаточно.

Цель работы

Определение соотношения уровней экспрессии ММР-9 и ТИМР-1, а также площади иммунопозитивных клеток в холангиоцеллюлярном и гепатоцеллюлярном раке печени.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов печени 94 больных, среди которых 55 (58,51%) страдали ГЦК, 39 (41,49%) – ХЦК печени. Средний возраст больных ГЦК составил 61,94±12,16 года (26–81 год), ХЦК – 58,46±11,52 года (33–83 года). 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 стандартизированными протоколами в парафиновых срезах ткани печени после температурного демаскирования антигенов и подавления активности эндогенной пероксидазы проведены ИГХ-исследования с использованием соответствующих первичных антител и системы визуализации DAKO EnVision+ System («ДАКО», Дания) с диаминобензидином (DAB). Экспрессию клетками печени матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) и ее тканевого ингибитора ТИМР-1 осуществляли с использованием поликлональных антител Rb a-Hu MMP-9 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) и моноклональных антител Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров опухолевыми клетками и площадь иммунопозитивных опухолевых клеток определяли фотоцифровой морфометрией. Для количественной оценки уровня экспрессии ММР-9 и ТИМР-1 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 ×200 в 5 полях зрения и анализировали с использованием медицинской программы обработки цифровых изображений Image J [10]. В плагине Colour Deconvolution этой программы во встроенной схеме анализа «гематоксин+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 (черный) 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 ММР-9 и ТИМР-1-иммунопозитивными клетками в цифровых иммуногистохимических изображениях гепато- и холангиоцеллюлярного рака печени с использованием программы Image J определяли суммарную площадь экспрессии каждого 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 зна-

чения (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

Иммуногистохимические исследования показали, что у 92,73% больных в злокачественных клетках ГЦК печени определена цитоплазматическая экспрессия MMP-9. Почти у половины обследованных преобладал умеренный уровень экспрессии MMP-9 в ГЦК, он установлен у 49,09% больных – $72,28 \pm 20,3$ УЕОП, у 25,46% пациентов уровень экспрессии был низким и составлял $37,21 \pm 7,25$ УЕОП, а у 18,18% больных отмечен высокий уровень экспрессии MMP-9 клетками ГЦК, составлявший $167,71 \pm 46,61$ УЕОП. У 7,27% больных экспрессия MMP-9 в клетках ГЦК была крайне низкой и составляла $8,00 \pm 2,12$ УЕОП, что расценивали как негативную экспрессию.

При фотоцифровой морфометрии установлено, что площадь, занимаемая MMP-9-иммунопозитивными клетками, составляла в среднем $59,33 \pm 22,57\%$ площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака. Одиночные MMP-9-позитивные опухолевые клетки или их группы обнаружены как в центре опухоли, так и на ее периферии. Кроме этого, у 36,36% больных установлен низкий либо умеренный уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 в гепатоцитах перитуморозной ткани печени.

Y. Ishii et al. [11] также наблюдали экспрессию MMP-9 в клетках ГЦК в 50,0% наблюдений, в 43,4% случаев – экспрессию MMP-9 в окружающей неопухолеговой ткани. Yan Zhang et al. [12] положительную экспрессию MMP-9 в ГЦК обнаружили у 76,68% пациентов. По данным D. Nart et al. [13], положительная экспрессия MMP-9 отмечена в 74,2% ГЦК, низкий уровень экспрессии этого фермента установлен в 30,3% наблюдений, а умеренный уровень экспрессии MMP-9 – в 43,8% случаев.

Повышенный уровень MMP в ГЦК играет важную роль в росте этой опухоли, в опухолевом ангиогенезе и метастазировании [13–16]. Секретируя MMP, клетки ГЦК расщепляют коллаген IV типа, который является основным компонентом базальных мембран печени [15], проникают во внеклеточный матрикс и мигрируют к кровеносным сосудам, что приводит к инвазивному распространению опухоли в печени и быстрому прогрессированию заболевания. Поэтому стало аксиомой, что повышенная экспрессия MMP-9 коррелирует с большим размером ГЦК и ее высокой агрессивностью [17, 18].

При исследовании экспрессии TIMP-1 мы установили, что экспрессия этого тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ в клетках ГЦК отмечена у 80% больных. Высокий уровень экспрессии TIMP-1 ($170,5 \pm 41,43$ УЕОП) установлен в 18,18% случаев ГЦК, умеренный уровень экспрессии этого фермента ($85 \pm 16,69$ УЕОП) – у 14,55% больных ГЦК, низкий уровень экспрессии TIMP-1 ($28,35 \pm 5,89$ УЕОП) – у 47,27% больных ГЦК. TIMP-1-иммунопозитивные клетки обнаружены и в центре, и на периферии опухоли; они занимали $21,94 \pm 6,27\%$ площади

среза ткани ГЦК, т.е. меньшую площадь, чем MMP-9-позитивные клетки в этой опухоли. Young-Eun Joo et al. [19] обнаружили экспрессию TIMP-1 не только в ткани ГЦК, но и в прилежащей неопухолеговой ткани, при этом очевидных различий между уровнем экспрессии TIMP-1 в этих участках не установили.

Некоторые авторы указывают, что высокая экспрессия MMP и TIMP в ткани ГЦК может быть также обусловлена взаимодействием опухолевых клеток с внеклеточным матриксом опухоли. Имеются данные, что аккумуляцию внеклеточного матрикса наблюдают в 90% ГЦК печени человека, и в нем участвуют MMP-1, 2, 9 и 13, а также TIMP-1 и 2. Так, N. Theret et al. [5] показали, что накопление внеклеточного матрикса в опухоли вызывает избыточную экспрессию MMP-2 как клетками гепатоцеллюлярной карциномы, так и мезенхимными клетками печени. Ремоделирование внеклеточного матрикса ГЦК обычно ассоциируется с прогрессией опухоли и возрастанием ее метастатического потенциала [5, 20].

При иммуногистохимическом анализе ХЦК печени выяснили, что у 89,74% больных в опухолевых клетках определялась цитоплазматическая экспрессия MMP-9. Высокий ($134,04 \pm 21,47$ УЕОП) и умеренный ($74,83 \pm 14,64$ УЕОП) уровень экспрессии MMP-9 клетками ХЦК установлен у одинакового процента больных (по 30,77%), а низкий уровень экспрессии MMP-9 ($32,88 \pm 9,60$ УЕОП) отмечен у 28,21% пациентов. В 10,25% случаев в ХЦК определен крайне низкий уровень экспрессии MMP-9 ($9,16 \pm 3,70$ УЕОП), расцененный как негативный. По данным фотоцифрового анализа MMP-9, иммунопозитивные опухолевые клетки составляли в среднем $52,71 \pm 20,86\%$ среза ткани холангиоцеллюлярного рака. При этом у 5,12% больных ХЦК печени отмечена слабая позитивная экспрессия MMP-9 в цитоплазме гепатоцитов, расположенных вблизи опухоли.

Частота позитивной экспрессии MMP-9 в ХЦК, установленная другими исследователями, широко варьирует и колеблется от 43% [21] до 73% [8] и даже до 95% [9]. K. Itatsu et al. [22] отметили позитивную иммуногистохимическую реакцию клеток ХЦК с MMP-9 у 47,5% больных, а с MMP-7 – у 75,8%.

По результатам наших исследований, положительная экспрессию TIMP-1 обнаружена в клетках ХЦК 74,36% пациентов. Высокий уровень экспрессии TIMP-1 ($137,42 \pm 12,66$ УЕОП) в ХЦК определен у 17,95% больных, умеренный ($75,75 \pm 11,68$ УЕОП) – у 20,51%, низкий уровень экспрессии TIMP-1 ($34,77 \pm 7,63$ УЕОП) в ХЦК – у 35,9% пациентов. Площадь TIMP-1 иммунопозитивных клеток составила $33,05 \pm 13,85\%$ площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени. Положительную экспрессию TIMP-1 в прилежащей неопухолеговой ткани у больных ХЦК печени мы не установили.

Сравнительный анализ уровней экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в ГЦК и ХЦК показал, что в обоих типах первичного рака печени MMP-9 иммунопозитивные клетки занимали более половины площади среза опухоли, высокий и средний уровень экспрессии MMP-9 в ГЦК и в ХЦК отмечен более чем у 60% больных (табл. 1).

**Основные параметры экспрессии MMP-9 и TIMP-1
в гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциноме печени**

Основные параметры экспрессии ферментов в опухоли	Гепатоцеллюлярная карцинома		Холангиоцеллюлярная карцинома	
	MMP-9	TIMP-1	MMP-9	TIMP-1
Процент больных с экспрессией ферментов в опухоли	92,73%	80%	89,74%	74,36%
Площадь иммунопозитивных клеток в опухоли	59,33±22,57%	21,94±6,27%	52,71±20,86%	33,05±13,85%
Процент больных с высоким уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	18,18%	18,18%	30,77%	17,95%
Процент больных с умеренным уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	49,09%	14,55%	30,77%	20,51%
Процент больных с низким уровнем экспрессии ферментов клетками опухоли	25,46%	47,27%	28,21%	35,9%

Высокий либо умеренный уровень экспрессии MMP-9 клетками гепатоцеллюлярного и холангиоцеллюлярного рака печени отмечен у больных с низким уровнем экспрессии TIMP-1 в этих же типах опухолей.

Исследования, проведенные в течение последнего десятилетия, показали, что MMP играют ключевую роль в процессах ангиогенеза, быстрого роста, инвазии и метастазирования холангио- и гепатоцеллюлярного рака печени [5,9,11]. Z.H. Gao et al. [7] сделали вывод, что повышенный уровень экспрессии MMP-1, 7 и снижение экспрессии E-кадгерина в гепатоцеллюлярной карциноме, развившейся фоне цирроза печени, создает более благоприятные условия для инвазии и метастазирования по сравнению с аналогичной опухолью в нецирротической печени. При низком уровне MMP-9 и 3 в низкодифференцированной гепатоцеллюлярной карциноме внепеченочные метастазы развиваются реже, чем у больных ГЦК с высоким уровнем MMP-9 и 3 в опухоли. При избыточной экспрессии MMP мембранного типа в ГЦК высока вероятность развития внепеченочных метастазов этой опухоли [6]. Qi Sun et al. [23] установили, что высокий уровень MMP-9 в холангиоцеллюлярной карциноме коррелирует с опухолевой прогрессией и неблагоприятным прогнозом. Пациенты с высоким уровнем экспрессии MMP-9 в ХЦК отличались низкой продолжительностью жизни, в отличие от пациентов с отрицательным или низким уровнем экспрессии MMP-9.

Корреляционный анализ, проведенный в нашем исследовании, показал: у больных ГЦК и ХЦК между

высоким уровнем экспрессии MMP-9 и низким уровнем экспрессии TIMP-1 опухолевыми клетками отмечена прямая сильная связь (коэффициент Пирсона – $r=+0,67$ и $r=+0,85$ соответственно).

Таким образом, наши данные о высоком или умеренном уровне экспрессии MMP-9 и одновременно низком уровне экспрессии TIMP-1 свидетельствуют о высоком потенциале инвазивности и агрессивности ГЦК и ХЦК.

Выводы

1. У 92,73% больных гепатоцеллюлярной карциномой и 89,74% больных холангиоцеллюлярной карциномой в злокачественных клетках определена цитоплазматическая экспрессия MMP-9. MMP-9-иммунопозитивные клетки составляли 59,33±22,57% площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака и 52,71±20,86% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

2. У 80% больных в гепатоцеллюлярной карциноме и 74,36% больных в холангиоцеллюлярной карциноме в опухолевых клетках установлена цитоплазматическая экспрессия TIMP-1. TIMP-1-иммунопозитивные клетки составляли 21,94±6,27% площади среза ткани гепатоцеллюлярного рака печени и 33,05±13,85% площади среза ткани холангиоцеллюлярного рака печени.

3. В гепатоцеллюлярной и холангиоцеллюлярной карциноме между высоким уровнем экспрессии опухолевыми клетками MMP-9 и низким TIMP-1 установлена прямая сильная связь (коэффициент Пирсона – $r=+0,67$ и $r=+0,85$ соответственно), что свидетельствует о высоком инвазивном потенциале этих опухолей.

Список литературы

- Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview / C.J. Malemud // *Front Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1696–1701.
- Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse, H. Nagase // *Circ Res.* – 2003. – Vol. 92(8). – P. 827–839.
- Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma / Joo, Y-E, Seo, Y-H, Lee, et al. // *Korean J Intern Med.* – 2000. – Vol. 15(3). – P. 171–178.
- A matrix metalloproteinase inhibitor to treat unresectable cholangiocarcinoma / J.J. French, M.J. Midwinter, M.K. Bennett et al. // *HPB (Oxford).* – 2005. – Vol. 7(4). – P. 289–297.
- Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas / N. Theret, O. Musso, B. Turlin, et al. // *Hepatology.* – 2001. – Vol. 34(1). – P. 82–88.
- 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. – Vol. 11(40). – P. 6269–6276.
- 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. – Vol. 19(4). – P. 533–540.
- Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Apomucins, Matrix Metalloproteinases, and p53 in Rat and Human Cholangiocarcinoma / YY. Jan, TS. Yeh, JN. Yeh et al. // *Ann Surg.* – 2004. – Vol. 240(1). – P. 89–94.
- 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. – Vol. 45(1). – P. 52–59.
10. Rasband W.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA / W.S. Rasband, J. Image Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012.
 11. 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. – Vol. 22(3). – P. 461–470.
 12. Elevated expression levels of androgen receptors and matrix metalloproteinase-2 and -9 in 30 cases of hepatocellular carcinoma compared with adjacent tissues as predictors of cancer invasion and staging / Yan Zhang, Yucheng Shen, Bin Cao et al. // *Experimental and therapeutic medicine.* – 2015. – Vol. 9(3). – P. 905–908.
 13. 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. – Vol. 16(5). – P. 621–630.
 14. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas / G.J. McKenna, Y. Chen, R.M. Smith et al. // *Am J Surg.* – 2002. – Vol. 183(5). – P. 588–594.
 15. Jiang Y.F. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy / Y.F. Jiang, Z.H. Yang, J.Q. Hu // *World J Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 6(1). – P. 61–65.
 16. Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinases: relevance to intracellular signaling pathways / E. Roeb, A.K. Bosserhoff, S. Hamacher et al. // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1096–1104.
 17. Increased levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatocellular carcinoma / E. Matsumoto, H. Nakatsukasa, K. Nouse et al. // *Liver Int.* – 2004. – Vol. 24(4). – P. 379–383.
 18. Кутихин А.Г. Прогностическая роль и молекулярно-биологические аспекты формирования капсулы гепатоцеллюлярной карциномы: обзор литературы / А.Г. Кутихин, Л.В. Начева, Ю.А. Магарилл // *Сибирский онкологический журнал.* – 2009. – №6(36). – С. 70–77.
 19. Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma / Y.E. Joo, Y.H. Seo, W.S. Lee et al. // *Korean J Intern Med.* – 2000. – Vol. 15(3). – P. 171–178.
 20. Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung / S. Sawada, K. Murakami, J. Murata et al. // *Int J Oncol.* – 2001. – Vol. 19(1). – P. 65–70.
 21. Expression of matrix metalloproteinase-9 in surgically resected intrahepatic cholangiocarcinoma / K. Shirabe, M. Shimada, K. Kajiyama et al. // *Surgery.* – 1999. – Vol. 126(5). – P. 842–846.
 22. 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. – Vol. 39(5). – P. 710–719.
 23. High expression of matrix metalloproteinase-9 indicates poor prognosis in human hilar cholangiocarcinoma / Qi Sun, Chuanzong Zhao, Leizhou Xia et al. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2014. – Vol. 7(9). – P. 6157–6164.
 24. Joo, Y-E, Seo, Y-H, Lee, W-S, Kim, H-S, Choi, S-K, Rew, J-S, et al. (2000) Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Intern Med.*, 15(3), 171–178.
 25. French, J. J., Midwinter, M. J., Bennet, M. K., Manas, D. M., & Charley, R. M. (2005) A matrix metalloproteinase inhibitor to treat unresectable cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*, 7(4), 289–291. doi: 10.1080/13651820510042246.
 26. Theret, N., Musso, O., Turlin, B., Lotrian, D., Bioulac-Sage, P., Campion, J.P., et al. (2001) Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 34(1), 82–88.
 27. Ip, Y. C., Cheung, S. T., Leung, K. L., Fan, S. T. (2005) Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 11(40), 6269–6276. doi: 10.3748/wjg.v11.i40.6269.
 28. Gao, Z. H., Tretiakova, M. S., Liu, W. H., Gong, C., Farris, P. D., & Hart, J. (2006) Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol.*, 19(4), 533–540.
 29. Jan, Y.Y., Yeh, T.S., Yeh, J.N., Yang, H.R., & Chen, M.F. (2004) Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Apomucins, Matrix Metalloproteinases, and p53 in Rat and Human Cholangiocarcinoma. *Ann Surg*, 240(1), 89–94. doi: 10.1097/01.sla.0000129492.95311.f2.
 30. Kim, H. J., Kim, J. S., Kang, C. D., Lee, S. J., Kim, J. Y., Yeon, J. E., et al. (2005). Expression of epidermal growth factor receptor, ErbB2 and matrix metalloproteinase-9 in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Korean J Gastroenterol.*, 45(1), 52–59.
 31. Rasband, W. S. & Image J. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012.
 32. Ishii, Y., Nakasato, Y., Kobayashi, S., Yamazaki, Y., & Aoki, T. (2003) A Study on Angiogenesis-Related Matrix Metalloproteinase Networks in Primary Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 22(3), 461–470.
 33. Yan, Zhang, Yucheng, Shen, Bin, Cao, Aiting, Yan, & Haoming, Ji (2015) Elevated expression levels of androgen receptors and matrix metalloproteinase-2 and -9 in 30 cases of hepatocellular carcinoma compared with adjacent tissues as predictors of cancer invasion and staging. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(3), 905–908.
 34. Nart, D., Yaman, B., Yilmaz, F., Zeytinlu, M., Karasu, Z., Kilic, M. (2010) Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Liver Transplantation*, 16(5), 621–630. doi: 10.1002/lt.22028.
 35. McKenna, G. J., Chen, Y., Smith, R. M., Meneghetti, A., Ong, C., McMaster, R. et al. (2002) A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas. *Am J Surg.*, 183(5), 588–594. doi: 10.1016/S0002-9610(02)00833-4.
 36. Jiang, Y. F., Yang, Z. H., Hu, J. Q. (2000) Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol*, 6(1), 61–65.
 37. Roeb, E., Bosserhoff, A.K., Hamacher, S., Jansen, B., Dahmen, J., Wagner, S. et al. (2005) Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinase: relevance to intracellular signaling pathways. *World J Gastroenterol*, 11, 1096–1104. doi: 10.3748/wjg.v11.i8.1096.
 38. Matsumoto, E., Nakatsukasa, H., Nouse, K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Suzuki, M., et al. (2004) Increased levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.*, 24(4), 379–383. doi: 10.1111/j.1478-3231.2004.0923.x.

References

1. Malesmud, C. J. (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*, 11, 1696–1701. doi: 10.2741/1915.
2. Visse, R., & Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827–839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.

18. Kutikhin, A. G., Natcheva, L. V., Magarill, Yu. A. (2009) Prognosticheskaya rol' i molekulyarno-biologicheskie aspekty formirovaniya kapsuly gepatocellyulyarnoj karcinomy: obzor literatury [Prognostic role and molecular-biological aspects of hcc capsule formation: review]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*, 6(36), 70–77. [in Russian].
19. Joo, Y. E., Seo, Y. H., Lee, W. S., Kim, H. S., Choi, S.K., Rew, J.S., et al. (2000) Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Intern Med*, 15(3), 171–178.
20. Sawada, S., Murakami, K., Murata, J., Tsukada, K., & Saiki, I. (2001) Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung. *Int J Oncol*, 19(1), 65–70. doi: 10.3892/ijo.19.1.65.
21. Shirabe, K., Shimada, M., Kajiyama, K., Hasegawa, H., Gion, T., Ikeda, Y., et al. (1999) Expression of matrix metalloproteinase-9 in surgically resected intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery*, 126(5), 842–846.
22. Itatsu, K., Zen, Y., Yamaguchi, J., Ohira, S., Ishikawa, A., Ikeda, H., et al. (2008) Expression of matrix metalloproteinase 7 is an unfavorable postoperative prognostic factor in cholangiocarcinoma of the perihilar, hilar, and extrahepatic bile ducts. *Hum Pathol*, 39(5), 710–719. doi: 10.1016/j.humpath.2007.09.016.
23. Qi, Sun, Chuanzong, Zhao1, Leizhou, Xia , Zhaobin, He, Zhihua, Lu , Chuan, Liu, et al. (2014) High expression of matrix metalloproteinase-9 indicates poor prognosis in human hilar cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(9), 6157–6164.

Сведения об авторах:

Туманский В.А., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E_mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Зубко М.Д., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет.

Відомості про авторів:

Туманський В.О., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E_mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Зубко М.Д., асистент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет.

Information about authors:

Tumanskiy V.A., MD, PhD, DSci, Professor, Head of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, E_mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua.

Zubko M.D., Assistant of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University.

Надійшла в редакцію 02.04.2015 р.