

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

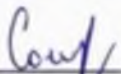
**«ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НА ОСНОВЕ СПЕКТРА
ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ, БИОХИМИЧЕСКИХ,
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ»**

Студент



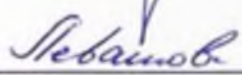
Широкова Анна Николаевна

Руководитель



Солдатов С. А.

Рецензент



Левашова О. А.

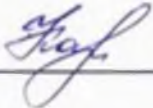
Нормоконтролер



Клыченков С. В.

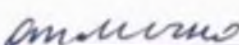
Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 31.05.25 № 12)

Заведующий кафедрой



Карпова Г. А.

Работа защищена с отметкой



(протокол заседания ГЭК от 29.06.25 № 6)

Секретарь ГЭК



Клыченков С. В.

Пенза, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1.Этиология, патология и классификация поражений печени.....	6
1.2.Обзор методов диагностики заболеваний печени.....	11
1.3. Дифференциальные методы диагностики первичного и вторичного рака печени.....	12
1.4. Клинические рекомендации.....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	20
2.1. Материалы исследования.....	20
2.2. Методы исследования.....	21
2.2.1. Биохимические методы.....	21
2.2.2. Иммуногистохимические методы.....	32
2.2.3. Гистологические исследования.....	34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
3.1. Результаты гистологических исследований.....	37
3.2. Результаты гистоцитохимических исследований.....	42
3.3. Результаты биохимических исследований.....	43
3.4 Анализ эффективности гистологических, иммуногистохимических и биохимических методов диагностики.....	55
ВЫВОДЫ.....	58
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	61

ВВЕДЕНИЕ

Проблема диагностики и лечения первичного и метастатического рака печени остается одной из самых сложных в лабораторной диагностике. Скрининг первичного рака печени нуждается в совершенствовании.

Рак печени представляет собой серьезную онкологическую проблему, включая как первичные опухоли (гепатоцеллюлярную карциному и холангиокарциному), так и вторичные метастатические поражения. Для точной дифференциации этих патологий необходим комплексный диагностический подход, сочетающий гистологические, биохимические и иммунологические методы исследования.

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире диагностируется свыше 250 тысяч новых случаев рака печени. Гепатоцеллюлярная карцинома занимает пятое место в структуре общей онкологической заболеваемости. Географическое распределение случаев заболевания носит неравномерный характер – наиболее высокие показатели зарегистрированы в странах Африки и Индокитайского региона.

На территории стран СНГ также наблюдается значительная вариабельность заболеваемости по регионам. Особенно тревожная ситуация сложилась в Якутии, где уровень заболеваемости первичным раком печени достигает 17 случаев на 100 тысяч населения, что значительно превышает средние показатели по другим регионам. Такие эпидемиологические особенности подчеркивают важность совершенствования методов ранней диагностики и дифференциации различных форм рака печени [18].

Первичные злокачественные новообразования печени встречаются значительно реже, чем метастатическое поражение этого органа – в 30-40 раз. Метастазы в печень обычно возникают при распространении злокачественных опухолей из других органов, включая желудок, толстую кишку, матку, яичники, легкие и молочную железу, а также при таких опухолях как нефробластомы, нейробластомы и тератобластомы.

Основными причинами развития гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) являются вирусы гепатита В и С, злоупотребление алкоголем и воздействие афлатоксина В, продуцируемого грибами *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Среди других значимых факторов риска можно выделить гемохроматоз, дефицит α 1-антитрипсина, позднюю кожную порфирию, болезнь Вильсона, первичный билиарный цирроз, неалкогольный стеатогепатит и ожирение. Однако именно вирусные гепатиты, алкоголь и афлатоксин играют наиболее важную роль в канцерогенезе [5,10,].

Важно отметить, что в 60-80% случаев ГЦР развивается на фоне уже существующего цирроза печени, который сам является следствием перечисленных факторов риска [15]. Лишь у менее чем 5% пациентов злокачественные новообразования печени возникают в неизменной печеночной ткани. К тому же рак печени в преобладающем большинстве случаев является фатально смертельным заболеванием: до 97% больных умирают в ближайшие сроки после установления диагноза [11, 20, 21]. Как гепатоцеллюлярная (ГЦК), так и холангиоцеллюлярная (ХЦК) карциномы резистентны к радио- и химиотерапии.

Географическое распределение ведущих этиологических факторов имеет свои особенности: в странах Европы, Северной Америки и Японии основную роль играет вирус гепатита С, тогда как в азиатских и африканских странах преобладает вирус гепатита В [26].

Учитывая значительную разницу в частоте встречаемости первичных и метастатических опухолей печени, а также сложность их дифференциальной диагностики, разработка эффективных алгоритмов обследования пациентов с подозрением на злокачественные поражения печени представляет собой важную и актуальную задачу.

Целью работы было изучить имеющиеся лабораторные методы диагностики заболеваний печени и сравнить гистологические, биохимические и иммунологические методы.

В связи с этим ставились и решались следующие задачи:

1. Изучить этиологию и классификацию заболеваний печени онкологической природы;
2. Рассмотреть гистологические методы диагностики;
3. Рассмотреть биохимические методы диагностики;
4. Рассмотреть иммуногистохимические методы;
5. Сравнить прогностическую ценность гистологических, биохимических и иммунологических методов исследования.

В работе были использованные материалы, поступившие в клинικο-диагностическую лаборатории ГБУЗ «Областное бюро судебно-медицинской экспертизы» в 2024-2025 гг.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология, патология и классификация поражений печени

Печень – это крупнейшая железа внешней секреции и важнейший орган пищеварительной системы, выполняющий более 500 жизненно необходимых функций.

Печень подвержена множеству патологий, которые можно систематизировать по этиологии, патогенезу, морфологическим изменениям и клиническим проявлениям. Ниже представлена обобщенная классификация заболеваний печени [22, 26, 28, 32, 33].

1. Инфекционные заболевания

- Вирусные гепатиты (А, В, С, D, Е, G);
- Бактериальные поражения (абсцессы печени, туберкулез, сифилис);
- Паразитарные инвазии (эхинококкоз, альвеококкоз, амебиаз, описторхоз);

2. Аутоиммунные заболевания

- Аутоиммунный гепатит (тип 1, 2, 3)
- Первичный билиарный холангит (ПБХ)
- Первичный склерозирующий холангит (ПСХ)
- Перекрестные синдромы (аутоиммунный гепатит + ПБХ/ПСХ)

3. Токсические и лекарственные поражения

- Алкогольная болезнь печени (стеатоз, гепатит, цирроз)
- Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)
- Неалкогольный стеатоз (НАСГ)
- Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ)
- Лекарственные гепатиты (токсическое действие парацетамола, антибиотиков, НПВС и др.)

- Отравления гепатотоксинами (афлатоксины, тяжелые металлы, промышленные яды)

4. Метаболические и наследственные заболевания

- Гемохроматоз (избыток железа)
- Болезнь Вильсона-Коновалова (нарушение метаболизма меди)
- Дефицит α 1-антитрипсина
- Гликогенозы
- Галактоземия
- Порфирии (поздняя кожная порфирия)

5. Сосудистые заболевания

- Портальная гипертензия (цирроз, тромбоз воротной вены)
- Синдром Бадда-Киари (тромбоз печеночных вен)
- Ишемический гепатит
- Печеночная веноокклюзионная болезнь
- Опухолевые заболевания
- Доброкачественные опухоли
- Гемангиома
- Фокальная нодулярная гиперплазия (ФНГ)
- Аденома печени

6. Злокачественные опухоли

- Первичные:
- Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК)
- Холангиокарцинома
- Гепатобластома (у детей)
- Ангиосаркома
- Метастатические (из ЖКТ, легких, молочной железы и др.)

7. Цирроз печени

- Вирусный (HBV, HCV)
- Алкогольный

- Аутоиммунный
- Билиарный (первичный/вторичный)
- Криптогенный

8. Врожденные аномалии и кистозные заболевания

- Поликистоз печени
- Синдром Кароли (врожденная дилатация внутripеченочных желчных протоков)
- Атрезия желчных путей

9. Заболевания, связанные с желчевыводящей системой

- Желчнокаменная болезнь
- Холестатические синдромы
- Острый и хронический холецистит

Первичные злокачественные опухоли печени представляют собой гетерогенную группу новообразований, развивающихся из различных структур печеночной паренхимы. Наибольшую клиническую значимость среди них имеет гепатоцеллюлярный рак (ГЦР), составляющий около 85% всех случаев первичного рака печени и происходящий из гепатоцитов. Особой разновидностью ГЦР является фиброламеллярная карцинома, имеющая отличные молекулярно-генетические характеристики, но все же классифицируемая как вариант ГЦР.

Этиология ГЦР тесно связана с хроническими вирусными гепатитами – на их долю приходится 75-80% случаев заболевания. При этом гепатит В (HBV) ответственен за 50-55% случаев, а гепатит С (HCV) – за 25-30%. Механизмы канцерогенеза при этих инфекциях различаются: HBV как ДНК-содержащий вирус способен интегрироваться в геном гепатоцита, вызывая генетические перестройки, тогда как HCV преимущественно действует через хроническое воспаление и цирротическую трансформацию (наблюдается в 97% случаев HCV-ассоциированного ГЦР). Особенно высок риск при

коинфекции HBV и HCV, где HBV играет инициирующую, а HCV - промоторную роль в канцерогенезе.

Реже встречаются другие формы первичного рака печени. Холангиокарциномы, развивающиеся из эпителия желчных протоков, составляют до 15% случаев и подразделяются на мелкопротоковые и крупнопротоковые варианты. Особый интерес представляет комбинированная гепатохолангиокарцинома, клинически схожая с мелкопротоковой холангиокарциномой, но имеющая отличные молекулярные характеристики. Крайне редки опухоли мезенхимального происхождения – саркомы и гемангиоэндотелиомы.

На молекулярном уровне в развитии ГЦР участвуют различные онкогены (K-ras, ErbB-2, c-met и др.) и гены-супрессоры (p53, APC, p-16). Особое значение имеет мутация гена p53, обнаруживаемая у 50-75% больных и часто связанная с воздействием афлатоксина В1. В случае холангиокарциномы наиболее изученным онкогеном является K-ras, активация которого наблюдается в 21-100% случаев [4, 5, 14, 24, 37, 38].

Клинически первичный рак печени часто проявляется мультифокальным поражением, возможны сочетания различных морфологических вариантов, включая синхронное или метасинхронное развитие ГЦР и холангиокарциномы. Это морфологическое разнообразие имеет важное значение для выбора тактики лечения, что подчеркивает необходимость точной патоморфологической диагностики [1].

Таким образом, первичные злокачественные опухоли печени представляют собой сложную и разнородную группу заболеваний с различными этиологическими факторами, молекулярными механизмами и клиническими проявлениями, что требует комплексного подхода к их диагностике и лечению.

Макро- и микроскопические характеристики первичного рака печени.

Макроскопические формы:

Первичный рак печени имеет три основные формы роста:

1. Массивная форма, при которой отличим единичный крупный опухолевый узел и доминирующий крупный узел с периферическими метастазами.

2. Для узловой формы характерно наличие множественных узлов примерно одинакового размера в одной или обеих долях печени;

3. Диффузная форма – наиболее редкая. Характеризуется мелкими опухолевыми очагами, напоминающими участки регенераторной гиперплазии, обычно поражает обе доли печени.

Микроскопические формы:

1. Гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) составляет 58-76% первичных опухолей печени, преобладает у мужчин (в 2 раза чаще), Довольно часто ассоциирован с циррозом печени. Характерна сосудистая инвазия с возможным тромбозом воротной вены [20].

Макроскопические показатели: цвет варьирует от серо-белого до зеленовато-коричневого, консистенция обычно мягкая. Гистологические варианты:

- Трабекулярный (наиболее частый)
- Псевдожелезистый (ацинарный)
- Компактный
- Скиррозный

2. Холангиоцеллюлярный рак (ХЦР) составляет 7-35% первичных опухолей, пик заболеваемости приходится на 50-70 лет, характерно равномерное распределение между полами, при этом редко сочетается с циррозом [40].

Гистологическая картина : клетки, напоминающие эпителий желчных протоков, так же отмечается наличие многоядерных гигантских клеток, продукция слизи.

3. Смешанный гепатохолангиоцеллюлярный рак – редкая форма рака. Сочетает признаки ГЦР и ХЦР, а так же характерна одновременная продукция желчи и слизи [7].

4. Гепатобластома составляет 1-6% всех злокачественных опухолей у детей преимущественно до 2 лет, может сочетаться с врожденными аномалиями.

Гистологические варианты:

- Эпителиальный (фетальные и эмбриональные клетки)
- Смешанный (эпителиально-мезенхимальный) с элементами саркомы [7].

1.2. Обзор методов диагностики заболеваний печени

Опухоли печени включают большую группу новообразований злокачественного (первичный и метастатический рак печени) и доброкачественного (аденома, гемангиома, фокальная узловая гиперплазия печени и др.) характера [7, 39, 40].

История диагностики заболеваний печени отражает прогресс медицинской науки – от простых наблюдений до сложных молекулярных и визуализационных методов. Современные технологии позволяют выявлять патологии на ранних стадиях, что значительно улучшает прогноз для пациентов.

Первые попытки диагностики заболеваний печени основывались на внешних проявлениях, таких как желтуха, асцит и изменение цвета мочи. В трудах Гиппократ (V–IV вв. до н. э.) описаны признаки поражения печени, включая желтушность кожи и увеличение живота. В Древнем Китае и Египте использовали травяные пробы для оценки состояния печени, что можно считать прообразом функциональных проб. С появлением микроскопии и биохимии методы диагностики стали более объективными. Впервые описал жировую дистрофию печени при гистологическом исследовании Н. Thaler в 1962 г., однако, автор не разделял эту патологию на алкогольную и неалкогольную. В 1980 г. J. Ludwig впервые описал клинические особенности заболевания печени неалкогольной этиологии [43]. В 1918 г. ван

ден Берг разработал метод дифференциации прямого и непрямого билирубина, что стало прорывом в диагностике желтух. В 1930-х гг. открытие щелочной фосфатазы (ЩФ) позволило выявлять холестаз. Во второй половине XX века появились новые технологии. В 1947 г. была выполнена первая пункционная биопсия печени по методике Менгини и Сильвермана. В 1960-х гг. открытие австралийского антигена (HBsAg) Бламбергом положило начало серологической диагностике гепатита В. В 1970-х гг. внедрение УЗИ и КТ революционизировало визуализацию печени [25]. Современные методы отличаются высокой точностью. В 1989 г. идентифицирован вирус гепатита С (HCV), что позволило разработать ПЦР-диагностику [25]. В 2000-х гг. появилась эластография (Фиброскан) для оценки фиброза без биопсии [35]. В 2010-х гг. внедрены технологии жидкостной биопсии и секвенирования ДНК для персонализированной диагностики опухолей [34].

1.3. Дифференциальные методы диагностики первичного и вторичного рака печени

Первичные и вторичные злокачественные новообразования печени ежегодно выявляются у не большого, но постепенно возрастающего количества больных [1, 7, 41, 36]. Более 90% всех злокачественных новообразований печени составляют вторичные (метастатические) опухоли [1, 6]. По данным ряда авторов, опухоли, выявляемые при первичном обращении пациентов, более чем в половине случаев имеют большие размеры и диагностируются в далеко зашедших стадиях [1, 6, 7, 16, 27].

Гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) – первичный рак из гепатоцеллюлярных клеток паренхимы печени, является одной из наиболее злокачественных форм рака печени [2, 40, 42]. По данным разных авторов, доля ГЦР среди первичного рака печени составляет более 90%. ГЦР часто развивается на фоне цирроза печени, что затрудняет раннюю диагностику рака и в

значительной степени снижает шансы на радикальную операцию. Известно, что ГЦР занимает шестое место среди самых распространенных видов опухолей, составляя 7% всех случаев рака. По частоте среди всех злокачественных новообразований у мужчин рак печени занимает 7-е, у женщин – 9-е место. Несмотря на высокую распространенность ГЦР, процент выявления данной патологии на ранних стадиях остается весьма низким. ГЦР является третьей по частоте причиной смертности от рака во всем мире [2, 3, 12,]. По экспертной оценке ВОЗ, ежегодно в мире от ГЦР погибает более 1,3 млн человек [3, 25].

Холангиоцеллюлярный рак (ХЦР). ХЦР или холангиокарцинома – это злокачественная опухоль, исходящая из эпителия желчных протоков разного уровня и развивается преимущественно в печени без явлений цирроза. По частоте заболевание встречается реже, чем ГЦР, и составляет 10% всех первичных опухолей печени. Большинство авторов ХЦР по локализации подразделяют на внутри- и внепеченочный. Внутрипеченочное поражение встречается в 10-25% случаев. Внепеченочные поражения разделяют на воротные (опухоль Клацкина) и дистальные внепеченочные опухоли [7, 25, 43].

Проблема диагностики и лечения первичного и метастатического рака печени остается одной из самых сложных в клинической онкологии. Скрининг первичного рака печени нуждается в совершенствовании. Сегодня он основан на определении в крови лиц группы риска 1 раз в 6 месяцев уровня α -фетопротеина и в случае его повышении более 15 мкг/л (исключая беременных женщин) – на выполнении ультразвукового исследования печени. В группу риска входят лица мужского пола старших возрастных групп – носители поверхностного антигена вирусного гепатита В [1].

Вторичный рак печени – злокачественное новообразование печени метастатического характера. Вероятность возникновения метастатических опухолей в 30 раз превышает первичные случаи рака печени. Часто метастазирование происходит на ранних стадиях заболевания и в

дальнейшем доминирует в клинической картине. По уточненным данным ряда исследователей, по локализации метастазов рака печень занимает 1-е место среди всех органов. По результатам вскрытий метастазы в печени обнаруживаются у 33-70% онкологических больных. Метастазы злокачественных опухолей особенно часто регистрируются при новообразованиях поджелудочной железы, желудка, толстой кишки и молочной железы [1, 7, 27, 30,31].

Выявление метастатических поражений печени основано на иммунохимическом и инструментальном мониторинге лиц, леченных по поводу злокачественных опухолей других локализаций. Наибольшее практическое значение здесь имеют серологические онкомаркеры: а-фетопrotein, раково-эмбриональный антиген, опухолевые антигены СА 19-9 и СА 125, хорионический гонадотропин, простатический специфический антиген. Роль этих маркеров при метастатическом раке печени диагностически значима, если их уровень до лечения по поводу первичных опухолей был повышен [17, 24, 37, 38, 39]. Существуют и дополнительные биохимические маркеры метастатического поражения печени: щелочная фосфатаза, трансаминазы, лактатдегидрогеназа и др [4, 5, 14, 24, 37, 38].

УЗИ органов брюшной полости в настоящее время является скрининговым методом выявления опухолей и опухолеподобных процессов печени [7]. Однако в ряде случаев провести дифференциальную диагностику между диффузными заболеваниями не представляется возможным из-за схожести эхографических признаков. Эхография в В-режиме с доплерографией сосудистой системы печени с оценкой состояния гемодинамики позволяет уточнить характер патологического процесса [15, 28, 40]. Однако, несмотря на высокую специфичность (97 %), чувствительность метода в выявлении опухолей печени остается достаточно низкой (60%). Кроме того, по мнению отдельных исследователей, информативность диагностического заключения УЗИ, как субъективного

метода исследования, зависит от опыта и квалификации врача УЗ диагностики [7, 19].

1.4. Клинические рекомендации

Лабораторные диагностические исследования рекомендуется пациентам с подозрением на онкологические заболевания печени или установленным диагнозом ГЦР с целью определения этиологии и выраженности сопутствующего заболевания печени, а также выявления показаний к назначению сопутствующей противовирусной терапии определить антитела к поверхностному антигену (HBsAg) вируса гепатита В (Hepatitis B virus) и антитела классов М и G (anti-HCV IgG и anti-HCV IgM) к вирусу гепатита С (Hepatitis C virus) в крови; при положительном результате теста на HBsAg необходимо определение антигена (HbeAg) вируса гепатита В (Hepatitis B virus) в крови, и определение ДНК HBV (количественный тест) и РНК-ВГД (качественный тест); при положительном результате теста на anti-HCV-исследование на РНК-ВГС (количественный тест и генотип вируса). Уровень убедительности рекомендаций – С (уровень достоверности доказательств – 5).

Для объективной оценки степени выраженности изменений в гемограмме и выявления возможного нарушения функции печени и почек рекомендуется выполнить общий (клинический) анализ крови развернутый (с подсчетом количества тромбоцитов) и анализ крови биохимический общетерапевтический – с измерением уровня сывороточного альбумина, общего и прямого билирубина, мочевины и креатинина, АЛТ, АСТ, ГГТ, ЩФ – анализ крови, определение протромбинового времени и международного нормализованного отношения, общий (клинический) анализ мочи [9, 16, 29]. Уровень убедительности рекомендаций – С (уровень достоверности доказательств – 5).

Так же рекомендуется выполнить определение концентрации в плазме опухолеспецифического маркера альфа-фетопротейна (АФП) для оценки агрессивности заболевания и прогноза его течения, контроля эффективности лечения. [16] Уровень убедительности рекомендаций – С (уровень достоверности доказательств – 5).

Результат анализа на АФП считается положительным, если уровень АФП > 100 нг/мл или если он увеличивался на 7 нг/мл в месяц по результатам 3 последовательных измерений. Следует учитывать, что уровень АФП также может повышаться при хронических заболеваниях печени, например, при острых и хронических вирусных гепатитах, при других онкологических заболеваниях (гепатоидном раке желудка, герминогенных опухолях и т.д.), при беременности.

Инструментальные диагностические исследования.

Для морфологического подтверждения диагноза рекомендуется пациентам с подозрением на онкологию выполнить биопсию под контролем УЗИ/КТ для уточнения диагноза в следующих случаях:

1. если по данным КТ или МРТ заподозрено патологическое образование в нецирротической печени;
2. если необходимо исключить злокачественную опухоль печени при отсутствии рентгенографических специфических признаков ГЦР в цирротической печени

Уровень убедительности рекомендаций – С (уровень достоверности доказательств – 5).

Пункционная биопсия опухоли печени с получением столбика ткани (*core* биопсия) предпочтительнее аспирационной тонкоигольной биопсии. Биопсия рекомендуется при малом размере опухоли (< 2 см) и типичном для ГЦР кровотоке, нетипичной васкуляризации узла размером > 2 см, расхождениях в описании и трактовке контрастных динамических исследований в сочетании с нормальным или незначительно повышенным

уровнем АФП, выявлении любого опухолевого образования в нецирротической печени [1, 13, 29].

Отрицательный результат биопсии не исключает диагноза злокачественной опухоли печени и предполагает дальнейшее наблюдение с возможностью повторных биопсий. Биопсия локального образования в цирротической печени не нужна, если: 1) не планируется какого-либо лечения в связи с декомпенсированным циррозом и/или другой тяжелой патологией; 2) планируется резекция печени; 3) при циррозе мультифазная КТ и МРТ с контрастированием описывают признаки, специфичные для ГЦР (неравномерное контрастирование узла в артериальной фазе, затем "вымывание" в венозной). Для уточняющей диагностики раннего и высокодифференцированного ГЦР Международная консенсусная группа по опухолям печени рекомендует панель из 3 иммуногистохимических маркеров – HSP70 (HSPA7), глипикана 3 (GPC3) и глутаминсинтетазы (GS), а для выявления прогностически неблагоприятных случаев – цитокератин 19 (СК 19). В сложных для диагностики случаях целесообразно отправить гистопрепараты для исследования в специализированные центры. При выявлении смешанного гепатохолангиоцеллюлярного рака целесообразно определение микросателлитного статуса опухоли.

Стадирование по Барселонской системе [7, 29].

Барселонская система стадирования рака печени (Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) classification) – наиболее часто используемая классификация ГЦР, которая учитывает распространенность опухолевого процесса, функциональное состояние печени, объективное состояние пациента и предполагаемую эффективность лечения (рис. 1).

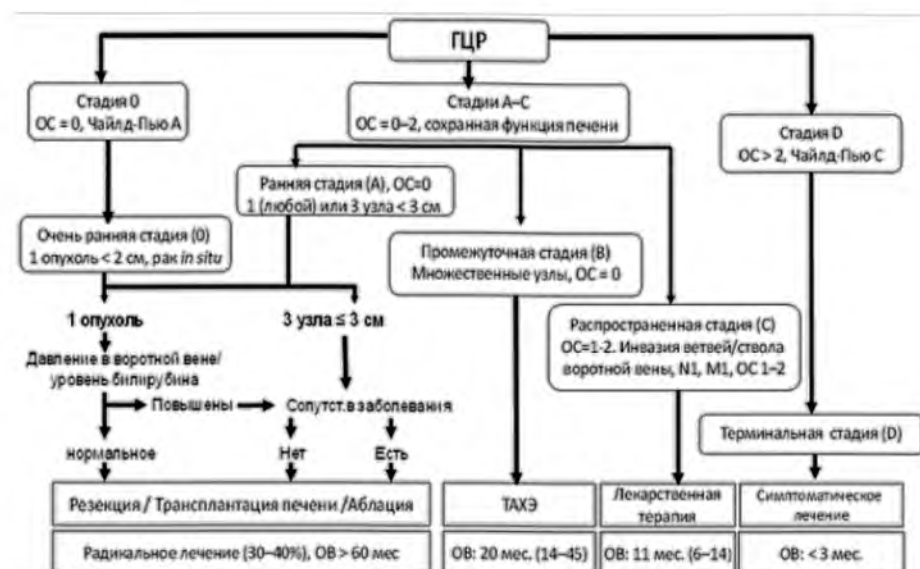


Рисунок 1. Барселонская система стадирования гепатоцеллюлярного рака. ОВ – общая выживаемость; ОС – объективный статус по шкале ECOG; TAXЭ – трансартериальная химиоэмболизация

Выделяют 5 стадий: от 0 – очень ранней и А – ранней до D – терминальной. Стадии по BCLC, равно как прогноз заболевания и тактика лечения, могут меняться при прогрессировании заболевания либо эффективном лечении. Следует отметить прогностическую значимость классификации для пациентов с ГЦР безотносительно наличия цирроза печени. Важная особенность этой классификации в том, что в ней предложен алгоритм лечения в зависимости от стадии заболевания. В последней редакции этой классификации (2018 г.) вместо классов цирроза A-B по Child-Pugh используется формулировка «сохранная функция печени», что соответствует оценке < 8 баллов по классификации Child-Pugh. Очень ранняя стадия (BCLC 0) – солитарная опухоль печени < 2 см в диаметре. Ранняя стадия (BCLCA) – солитарная опухоль печени любого размера или не более 3 узлов размером до 3 см, не распространяющиеся на магистральные сосуды печени, соседние анатомические структуры, у пациента без опухолеспецифических жалоб в удовлетворительном объективном состоянии (ECOG0) при сохранной функции печени. Промежуточная стадия (BCLC B) –

случаи изолированного бессимптомного множественного опухолевого поражения печени без макрососудистой инвазии у пациентов в удовлетворительном состоянии (ECOG0) при сохранной функции печени. Распространенная стадия (BCLC C) – симптомная опухоль, ухудшающая объективное состояние пациента (ECOG0 – 2), любого размера с инвазией или без инвазии в магистральные печеночные сосуды и/или с внепеченочным распространением при сохранной функции печени. Терминальная стадия (BCLCD) – случаи заболевания со значимым ухудшением объективного состояния (опухоль/цирроз), декомпенсацией цирроза (класс C по Child-Pugh). Но при выявлении малой опухоли (солитарной размером < 5 см или не более 3 узлов размером < 3 см) при соответствии так называемым «миланским» критериям возможна ортотопическая трансплантация печени [29].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Исследования проводились в течении нескольких лет (2024-2025 гг.) на базе в клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Областное бюро судебно-медицинской экспертизы». Объектом нашего исследования стали результаты гистологических и биохимических проб, взятых у пациентов разных возрастов, находившихся под наблюдением врачей государственных поликлиник г. Пензы, по поводу наличия патологических изменений печени.

В условиях лаборатории гистологическим методом было проанализировано 75 образцов прижизненных биопсий и 6548 образца посмертного материала, которые были собраны с 2024 по 2025 гг.

Иммуногистохимическим методом были исследованы 4 пациента с подозрением на злокачественные образования печени.

Методы биохимии более распространены и доступны, потому были отобраны образцы которые были собраны с 2024 по 2025 гг. Всего было обработано более 6 тыс. результатов исследований.

Далее нами была сформирована выборка из 10 пациентов, которым было проведено комплексное исследование по всем имеющимся методам диагностики.

У пациентов проводились исследования Anti-HBs и anti-HCV, активности ферментов – АСТ, АЛТ, ЩФ, ГГТ, карбогидратный антиген 19-9 (CA-19), раковоэмбриональный антиген (РЭА) и α -фетопротеин (АФП), а так же гепатоцитарный маркер (Hep Par-1).

2.2. Методы исследования

Морфологическая диагностика опухолей печени часто связана с большими трудностями. Это касается как различия ГЦК и ХЦК, так и выявления метастатических опухолей и определения их органной и тканевой природы, учитывая, что многие новообразования склонны метастазировать в печень.

2.2.1. Биохимические методы

Биохимические анализы помогают выявить антитела к гепатиту В и С, оценить функцию печени и выявить опухолевые маркеры.

При анализе на Anti-HBs используется иммуноферментный анализ (ИФА). Метод основан на взаимодействии антител в сыворотке крови с антигеном HBs, иммобилизованным на поверхности лунок планшета.

Кровь у пациентов берется натощак (8–12 часов без пищи), рекомендуется исключить курение и алкоголь за 24 часа, физические и эмоциональные нагрузки перед анализом. Используется венозная кровь (5–10 мл в пробирку с активатором свертывания или без антикоагулянта). После забора кровь центрифугируют для получения сыворотки.

Проведение анализа (ИФА). Проводится иммобилизация антигена – на поверхность лунок планшета наносит HBsAg. Далее инкубируют с образцом – в лунки добавляют сыворотку пациента. Если в ней есть Anti-HBs, они связываются с антигеном. Производят промывку, при которой удаляются несвязавшиеся компоненты. Добавляют конъюгат – антитело, меченное ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой), которое связывается с Anti-HBs. Снова промывают – удаляют избытки конъюгата. После добавляют субстрат – вносят хромогенный субстрат (например, ТМВ – тетраметилбензидин), который под действием фермента изменяет цвет. И останавливают реакцию – добавляют кислоту, прекращающую реакцию.

Измеряют оптическую плотность (ОП) – на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Интерпретация результатов:

- 10 мМЕ/мл – положительный результат (есть иммунитет после вакцинации или перенесенного гепатита В).
- < 10 мМЕ/мл – отрицательный результат (нет защитного иммунитета, возможна ревакцинация).

Методика проведения анализа крови на anti-HCV (антитела к вирусу гепатита С). Анализ anti-HCV проводится так же методом ИФА, который выявляет антитела (IgG и IgM) к вирусу гепатита С (HCV) в сыворотке крови.

Производят забор венозной крови в пробирки с активатором свертывания или ЭДТА (плазма). Далее анализ проводят по схожей методике. На поверхность лунок планшета наносятся рекомбинантные белки HCV (Core, NS3, NS4, NS5). Далее их инкубируют с сывороткой пациента, если в крови есть anti-HCV, они связываются с антигенами. Производят промывку, удаляют несвязавшиеся антитела и добавляют конъюгат – меченый ферментом (пероксидазой) анти-человеческий IgG/IgM, инкубируют 20–30 мин при +37°C. Повторно промывают и добавляют хромогенный субстрат (ТМВ – тетраметилбензидин). Фермент конъюгата вызывает изменение цвета (желтый → синий). Далее реакцию останавливает кислотой (цвет меняется на желтый). Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при 450 нм.

Интерпретация результатов:

- Anti-HCV отрицательный – антител нет (но возможна ранняя стадия)
- Anti-HCV положительный – Контакт с HCV (текущая или перенесенная инфекция).

Чувствительность данного анализа 98–99% (выявляет антитела через 4–10 недель после заражения).

Специфичность: >99,5% (ложноположительные результаты редки).

Количественного определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке и плазме крови человека проводилось кинетическим УФ – методом с помощью коммерческих тест систем.

Принцип метода. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ, КФ 2.6.1.2) определяется кинетическим УФ-методом по реакции трансаминирования между L-аланином и 2-оксоглутаратом. В результате образуются пируват и L-глутамат. Далее пируват в присутствии лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и NADH восстанавливается до лактата, а NADH окисляется до NAD^+ . Скорость уменьшения оптической плотности (OD) при длине волны 340 нм, пропорциональная расходу NADH, соответствует активности АЛТ.

Реактивы и оборудование. 1. Коммерческая тест-система (содержит готовые реагенты: буферный раствор, L-аланин, 2-оксоглутарат, NADH, ЛДГ).

2. При необходимости можно использовать калибратор.

3. Контрольные материалы (нормальный и патологический уровни).

4. Фотометр/биохимический анализатор с термостатируемой кюветной системой (температура $37 \pm 0,1$ °C).

5. Кюветы (оптический путь 1 см).

6. Микропипетки и дозаторы.

Ход анализа:

Подготовка образцов: Сыворотка или гепаринизированная плазма, при этом стоит избегать гемолиза, т. к. эритроциты содержат АЛТ. центрифугируют при 2000–3000 g в течение 10 мин. Стабильность сохраняется при $+2...+8$ °C – 48 ч, при -20 °C – 1 мес.

В кювету вносят рабочий реагент (объем согласно инструкции тест-системы) инкубируют 5 мин при 37 °C для стабилизации температуры, после добавляют образец (обычно 10–50 мкл), перемешивают. Далее регистрируют изменение оптической плотности при 340 нм в течение 1–3 мин (линейная фаза реакции).

Расчет активности АЛТ:

$$\text{Активность АЛТ (Ед/л)} = \frac{\Delta A / \text{мин} \times V_{\text{общий}} \times 1000}{\varepsilon \times d \times V_{\text{образца}}}$$

Где:

- $\Delta A / \text{мин}$ – изменение оптической плотности в минуту;
- $V_{\text{общий}}$ – общий объем реакционной смеси (мкл);
- ε – молярный коэффициент экстинкции NADH (6,22 см²/мкмоль);
- d – оптический путь кюветы (1 см);
- $V_{\text{образца}}$ – объем образца (мкл).

Контроль качества: Для контроля качества используют калибровочные материалы и контрольные сыворотки, и учитывают интерференцию (гемолиз, липемия, высокая активность ЛДГ).

Референсные значения:

Взрослые:

- Мужчины: ≤ 41 Ед/л
- Женщины: ≤ 31 Ед/л

Дети – зависят от возраста (выше, чем у взрослых).

Количественное определение активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке и плазме крови человека проводилось кинетическим УФ – методом (методом Райтмана-Френкеля) с помощью коммерческих тест систем.

Принцип метода. Активность аспартатаминотрансферазы определяется кинетическим УФ-методом (метод Райтмана-Френкеля) по реакции трансаминирования между L-аспартатом и 2-оксоглутаратом. В результате образуются оксалоацетат и L-глутамат. Оксалоацетат в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ) и NADH восстанавливается до малата, а NADH окисляется до NAD⁺. Уменьшение оптической плотности (OD) при 340 нм, пропорциональное расходу NADH, отражает активность АСТ.

Реактивы и оборудование: 1. Готовая тест-система (содержит буфер, L-аспартат, 2-оксоглутарат, NADH, МДГ).

2. Калибратор (при необходимости).

3. Контрольные сыворотки (нормальный и повышенный уровни).

4. Биохимический анализатор или спектрофотометр с термостатом ($37 \pm 0,1$ °C).

5. Кюветы (оптический путь 1 см).

6. Дозаторы и пипетки.

Ход анализа:

Подготовка образцов. Сыворотка или гепаринизированная плазма (без гемолиза, т. к. эритроциты богаты АСТ) центрифугируют при 2000–3000 g, 10 мин. Стабильность сохраняется при температуре +2...+8 °C – до 48 ч, –20 °C – до 1 месяца.

Проведение реакции. В кювету вносят рабочий реагент (объем по инструкции, инкубируют 5 мин при 37 °C для стабилизации температуры, добавляют образец (обычно 10–50 мкл), перемешивают. Далее измеряют снижение OD при 340 нм в течение 1–3 мин (линейная фаза).

Расчет активности АСТ:

$$\text{Активность АСТ (Ед/л)} = \frac{\Delta A / \text{мин} \times V_{\text{общий}} \times 1000}{\varepsilon \times d \times V_{\text{образца}}}$$

Где:

- $\Delta A / \text{мин}$ – скорость изменения оптической плотности;
- $V_{\text{общий}}$ – общий объем реакционной смеси (мкл);
- ε – коэффициент экстинкции NADH (6,22 см²/мкмоль);
- d – толщина кюветы (1 см);
- $V_{\text{образца}}$ – объем пробы (мкл).

Контроль качества: Для контроля качества используют калибровочные материалы и контрольные сыворотки, и учитывают интерференцию – гемолиз (ложное повышение из-за внутриклеточной АСТ), высокие концентрации лактата или пирувата могут влиять на NADH.

Референсные значения:

Взрослые:

- Мужчины: ≤ 35 Ед/л
- Женщины: ≤ 31 Ед/л

Дети: уровни выше, чем у взрослых (зависят от возраста).

Определения активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке и плазме крови человека проводилось кинетическим методом с помощью коммерческих тест систем.

Принцип метода. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяется кинетическим методом по гидролизу субстрата (обычно п-нитрофенилфосфата – пНФФ) в щелочной среде (рН ~9–10). Фермент отщепляет фосфатную группу от субстрата, образуя п-нитрофенол (пНФ), который при щелочном рН имеет желтую окраску. Интенсивность образования пНФ измеряется спектрофотометрически при длине волны 405–410 нм. Скорость нарастания оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$) пропорциональна активности ЩФ.

Реактивы и оборудование: 1. Готовая тест-система, которая содержит буферный раствор, п-нитрофенилфосфат, стабилизаторы, активаторы

2. Калибратор (стандарт с известной активностью ЩФ);

3. Контрольные сыворотки (нормальный и патологический уровни).

4. Биохимический анализатор или спектрофотометр с термостатом ($37 \pm 0,1$ °C).

5. Кюветы (оптический путь 1 см).

6. Микропипетки и дозаторы.

Ход анализа.

Подготовка образцов: для подготовки используют сыворотку (предпочтительно) или гепаринизированную плазму (ЭДТА и цитрат могут ингибировать ЩФ). Образцы не должны быть гемолизированными (гемоглобин поглощает при 405 нм). Далее проводят центрифугирование при 2000–3000 g, 10 мин. Стабильность сохраняется при

+2...+8 °C – до 7 дней, –20 °C – до 1 месяца (возможна частичная потеря активности).

Проведение реакции. В кювету вносят рабочий реагент (буфер + субстрат, объем по инструкции). Инкубируют 2–5 мин при 37 °C для стабилизации температуры. Далее добавляют сыворотку/плазму (обычно 5–20 мкл), перемешивают. Регистрируют нарастание оптической плотности при 405–410 нм в течение 2–5 мин (линейная фаза).

Количественное определение активности гама-глутамилтрансферазы (ГГТ) в сыворотке крови проводилось кинетическим методом с помощью коммерческих тест систем.

Принцип метода. Активность γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) определяется кинетическим методом по реакции переноса γ -глутамильного остатка с субстрата (γ -глутамил-п-нитроанилина) на акцептор (глицилглицин). В результате реакции образуется п-нитроанилин, который при щелочном pH имеет интенсивную желтую окраску. Скорость образования п-нитроанилина, измеряемая по нарастанию оптической плотности при 405–410 нм, пропорциональна активности ГГТ в образце.

Реактивы и оборудование.

1. Готовая тест-система, содержащая буферный раствор (Tris-HCl или другой, pH ~8.0–8.5), субстрат (γ -глутамил-п-нитроанилин), акцептор (глицилглицин), стабилизаторы и консерванты.

2. Калибратор с известной активностью ГГТ

3. Контрольные материалы (нормальный и патологический уровни)

4. Биохимический анализатор или спектрофотометр с термостатируемой кюветной системой ($37 \pm 0.1^\circ\text{C}$)

5. Кюветы с оптическим путем 1 см

6. Дозаторы и микропипетки

Ход анализа.

Подготовка образцов. Для подготовки образцов используют свежую сыворотку крови (гепарин может незначительно активировать

фермент, ЭДТА – ингибировать). Образцы должны быть без признаков гемолиза. Далее проводят центрифугирование при 2000-3000 g в течение 10 минут. Стабильность сохраняется при +2...+8°C до 7 дней, при -20°C - до 1 месяца.

Проведение реакции: В кювету вносят рабочий реагент (объем согласно инструкции производителя), инкубируют 5 минут при 37°C для температурной стабилизации, добавляют сыворотку (обычно 10-50 мкл), перемешивают и регистрируют увеличение оптической плотности при 405-410 нм в течение 2-5 минут (линейная фаза реакции).

Расчет активности ГГТ:

$$\text{Активность ГГТ (Ед/л)} = \frac{\Delta A / \text{мин} \times V_{\text{общий}} \times 1000}{\varepsilon \times d \times V_{\text{образца}}}$$

Где:

- $\Delta A / \text{мин}$ - скорость изменения оптической плотности
- $V_{\text{общий}}$ - общий объем реакционной смеси (мкл)
- ε - молярный коэффициент экстинкции п-нитроанилина (9.9 см²/мкмоль при pH 8.2)
- d - оптический путь кюветы (1 см)
- $V_{\text{образца}}$ - объем сыворотки (мкл)

Референсные значения:

Взрослые:

- Мужчины: < 55 Ед/л
- Женщины: < 38 Ед/л

Дети:

- Новорожденные: до 200 Ед/л
- Дети до 1 года: до 50 Ед/л
- Дети 1-15 лет: < 20 Ед/л

Количественное *in vitro* определения концентрации карбогидратного антигена СА 19-9 в сыворотке крови человека с помощью коммерческой тест системы.

Принцип метода. Метод основан на «сэндвич»-технологии с использованием моноклональных антител к эпитопу СА 19-9 (специализированной форме Lewis-a антигена). 1-е антитело (иммобилизовано на магнитных частицах) связывает антиген из образца. 2-е антитело (меченное хемилюминесцентной меткой, например, изотиоцианатом акридина) образует комплекс.

После промывки вводится активирующий раствор, вызывающий хемилюминесценцию. Интенсивность свечения пропорциональна концентрации СА 19-9.

Реактивы и оборудование

- 1.Тест-система (на примере ARCHITECT i2000, Cobas e601):
- 2.Калибраторы (0, 50, 250, 500, 1000 Ед/мл)
- 3.Контрольные материалы (низкий/высокий уровень)
- 4.Буферные растворы (промывочный, активационный)
- 5.Магнитные частицы с иммобилизованными антителами
- 6.Конъюгат (меченые антитела)

Оборудование:

- 1.Автоматический иммуноанализатор (например, Abbott ARCHITECT, Roche Cobas)
- 2.Центрифуга (для подготовки сыворотки)
- 3.Микропипетки

Ход анализа.

Для подготовки образца используют сыворотку крови (гепарин/ЭДТА могут влиять на результат). Далее производят центрифугирование(1500-2000 g, 10 мин). Стабильность сохраняется 24 ч при +2...+8°C, длительно при – 20°C (избегать повторного замораживания).

Проведение анализа (автоматизированный режим):

Этап 1: В лунку вносят 50–100 мкл сыворотки + магнитные частицы с антителами. Инкубация 10–18 мин (формирование комплекса).

Этап 2: Промывка для удаления несвязанных компонентов.

Этап 3: Добавление конъюгата. Инкубация 4–10 мин.

Этап 4: Промывка + введение активационного раствора. Измерение хемилюминесценции (длина волны ~430–460 нм).

Расчет концентрации: Анализатор строит калибровочную кривую по стандартам. Концентрация СА 19-9 в образце вычисляется автоматически (Ед/мл).

Референсные значения.

Норма: < 37 Ед/мл (для большинства популяций).

Клинически значимые уровни:

- 37–100 Ед/мл: Доброкачественные состояния (холестаз, панкреатит).
- 100 Ед/мл: Подозрение на опухоль (рак поджелудочной железы, ЖКТ).
- 1000 Ед/мл: Высокий риск метастазов.

Качественное иммунохроматографическое определение *in vitro* раково-эмбрионального (РЭА) антигена в образцах сыворотки, плазмы или цельной крови человека с использованием коммерческих тест систем. Принцип метода. Иммунохроматографический анализ (ИХА) основан на принципе "латерального потока" с использованием двух линий антител на тест-полоске:

- Тест-линия (иммобилизованные антитела к РЭА)
- Контрольная линия (антивидовые антитела)

Компоненты тест-системы:

1. Тест-кассета в пластиковом корпусе с конъюгатной зоной (высушенные меченые антитела), нитроцеллюлозной мембраной с тест/контроль линиями и абсорбирующая подушечка
2. Буфер для экстракции (при использовании цельной крови)
3. Пипетка для внесения образца

Ход анализа. Подготовка образца. Сыворотка или плазма используются без подготовки, цельная кровь смешивание с буфером в пропорции 1:5.

Проведение теста. Производится внесение 100 мкл образца в окошко кассеты, добавляют 2 капли буфера (если требуется). Ожидают 10-15 минут при комнатной температуре.

Интерпретация:

- Положительный – появление двух полос (тест+контроль)
- Отрицательный – одна контрольная полоса
- Недействительный – отсутствие контрольной полосы

Количественное определение содержания альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови человека выполняется методом одностадийного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест систем.

Принцип метода. Представляет собой одностадийный "сэндвич" – вариант ИФА основан на одновременной инкубации образца с двумя моноклональными антителами к разным эпитопам АФП. Первичные антитела иммобилизованы на поверхности лунок планшета, вторичные антитела конъюгированы с ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой).

Компоненты тест-системы:

1. Иммуносорбентный планшет (96 лунок с иммобилизованными антителами)
2. Конъюгат (меченые антитела)
3. Калибраторы (0, 10, 50, 100, 200 МЕ/мл)
4. Контрольные образцы (низкий/высокий уровень)
5. Буферные растворы (разбавитель образцов, промывочный буфер (10× концентрированный), субстратный раствор (ТМБ), стоп-раствор (1М H_2SO_4))

Ход анализа.

Подготовка образцов: Проводится центрифугирование сыворотки при 2000 g, 10 мин и разведение концентрированных образцов (1:10–1:100). Стабильность сохраняется 24 ч при +2..+8°C и 6 мес при -20°C.

Этап 1: В лунку вносят Внесение 50 мкл калибраторов/образцов + 50 мкл конъюгата. Инкубация при 37°C на шейкере (300 об/мин).

Этап 2: Промывка для удаления несвязанных компонентов.

Этап 3: Добавление Внесение 100 мкл субстрата. Инкубация 15 мин.

Этап 4: Промывка + введение активационного раствора. Считывание оптической плотности на микропланшетном ридере при 450 нм (коррекция 620–650 нм).

Следующий этап – построение калибровочной кривой.

Интерпретация результатов

Референсные значения:

Взрослые – < 7.0 (МЕ/мл)

Беременные (15–20 нед) – 10–150 (МЕ/мл)

Новорожденные (до 1 мес) – < 1000 (МЕ/мл)

Клинически значимые уровни:

- 10–400 МЕ/мл: хронические заболевания печени
- > 400 МЕ/мл: подозрение на гепатоцеллюлярную карциному
- > 1000 МЕ/мл: диагностический критерий герминогенных опухолей [9].

2.2.2. Иммуногистохимические методы

Проводят путём изучения срезов опухолевого материала под микроскопом после предварительного окрашивания. Это позволяет выявить и описать отклонения от нормы в структуре ткани, дать характеристику изменениям и сделать вывод о доброкачественности или злокачественности процесса [39].

Методика иммуногистохимического выявления гепатоцитарного маркера Нер Par-1 (Hepatocyte Paraffin 1) основана на использовании

коммерческого набора для окрашивания гистологического препарата полученного в результате биопсии. Методику можно описать общим образом.

Ход анализа

1. Подготовка материала

Фиксация ткани осуществляется обычно 10% нейтральным раствором формалина. Ткань обезвоживают, проводят через ксилол и заливают в парафин. На микротоме получают срезы толщиной 3–5 мкм, которые помещают на предметные стекла (желательно адгезивные).

1. Для депарафинизации и регидратации используют ксилол (2×5 мин) и градуированные спирты (100%, 96%, 70% – по 2–3 мин каждый).

2. Промывают в дистиллированной воде.

3. Антигенное демаскирование проводят при необходимости. Термическая обработка (в цитратном буфере pH 6,0 или EDTA pH 8,0) в автоклаве/водяной бане/микроволновой печи. Далее охлаждают до комнатной температуры (20–30 мин) и промывают в PBS (3×5 мин).

4. Блокирование эндогенной пероксидазы: Инкубация с 3% H_2O_2 (10–15 мин, комнатная температура). Промывка в PBS (3×5 мин).

5. Блокирование неспецифического связывания. Нанесение блокирующего раствора (5–10% нормальной сыворотки, BSA или коммерческий блокатор, 10–30 мин).

6. Инкубация с первичными антителами. Наносят характерные антитела (для каждого типа анализа индивидуальны), инкубируют 1 ч при комнатной температуре или ночь при $+4^\circ\text{C}$. Промывают в PBS (3×5 мин).

7. Инкубация с вторичными антителами. Наносят полимерные системы детекции (например, HRP-полимер, соответствующий виду первичных антител), инкубируют 30–60 мин, комнатная температура. Промывают в PBS (3×5 мин).

8. Визуализация. Наносят хромогены (DAB, АЕС – приводит к появлению коричневого/красного окрашивания) под микроскопом. Останавливают реакцию промывкой в дистиллированной воде.

9. Контрастирование и заключение. Для контрастирования наносят гематоксилин, который окрашивает ядра в синий. Закljučают под покровное стекло (например, в пермаунт).

10. Микроскопия и оценка.

Оценка экспрессии GPC3:

- Локализация (цитоплазматическая, мембранная).
- Интенсивность окрашивания (0 – нет, 1+ – слабая, 2+ – умеренная, 3+ – сильная).
- Процент позитивных клеток (например, >5% считается положительным).

2.2.3. Гистологические исследования

Гистологическое исследование – золотой стандарт диагностики опухолей печени. Биопсия печени с морфологическим анализом используются для диагностики хронических гепатитов, цирроза, стеатоза, опухолевых поражений, аутоиммунных и метаболических заболеваний печени. А так же оценки степени фиброза, воспаления, некроза и других патологических изменений.

Для прижизненной диагностики заболеваний печени используются: хирургическая биопсия (краевая резекция), различные варианты пункционной биопсии (слепая и прицельная).

Краевая резекция, выполняемая при лапаротомии, позволяет исследовать субкапсулярные участки.

Пункционная биопсия имеет меньше ограничений и позволяет исследовать разные зоны печени на разной глубине: производится иглой Менгини (чрескожная в VIII – IX межреберье по правой среднеподмышечной

линии). Чтобы исследователь мог дать ответственное заключение, образец ткани должен быть длиной не менее 2 см и содержать четыре порталных тракт.

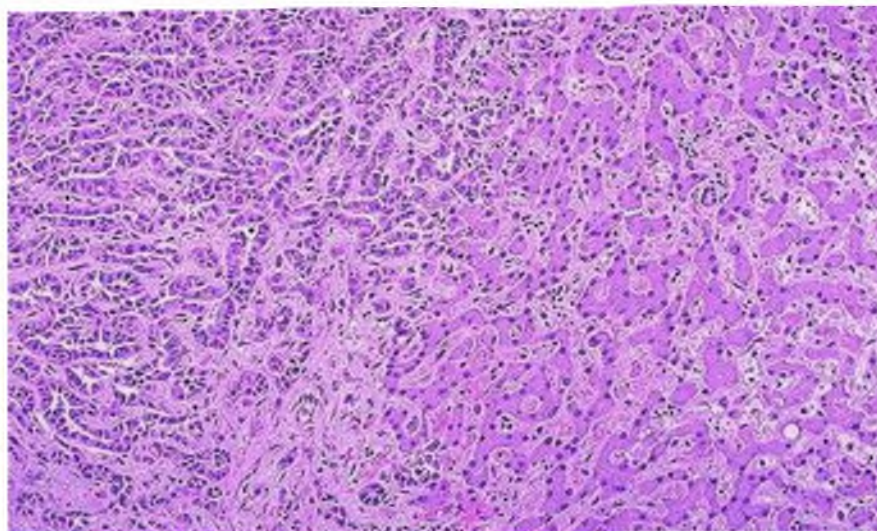


*Рисунок 2. Холангиоцеллюлярный рак. Окраска гематоксилином и
эозином. x 40*

Ход исследования:

1. Подготовка биоптата:

Фиксация: Материал сразу помещают в 10% нейтральный забуференный формалин (минимум на 6–12 часов). Для электронной микроскопии используют глутаровый альдегид.

Макроскопическое описание: Длина, диаметр, цвет, наличие фрагментов.

Проводка ткани: Производят обезвоживание в градуированных спиртах (70% → 96% → 100%). Далее проводят очистку в ксилоле.

Препарат пропитывают парафином (при 56–60°C).

2. Приготовление срезов: Производят заливку в парафиновые блоки. Микротомом производят срезы толщиной 3–5 мкм и накладывают на стекла. Производят просушку препаратов (60°C, 30–60 мин для лучшей адгезии).

3. Окрашивание: Используют стандартные гистологические окраски (гематоксилин и эозин)

Ход окрашивания:

- Депарафинизация (ксилол → спирты → вода).

- Гематоксилин (5–10 мин) → промывка водой.
- Дифференцировка в 1% кислом спирте (секунды).
- «Посинение» в проточной воде (5–10 мин).
- Эозин (1–2 мин).
- Обезвоживание → ксилол → заключение.

Результат: Ядра окрашиваются в синий, цитоплазма – в розовый, фиброз – в бледно-розовый.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Результаты гистологических исследований

В условиях лаборатории было проанализировано 75 образцов прижизненных биопсий и 6548 образцов посмертного материала, собранного в период с 2024 по 2025 гг. 1262 образца, содержали патологические изменения печени, соотносимые с различными заболеваниями.

Для прижизненной диагностики заболеваний печени используются: хирургическая биопсия (краевая резекция), различные варианты пункционной биопсии (слепая и прицельная).

Краевая резекция, выполняемая при лапаротомии, позволяет исследовать субкапсулярные участки.

Пункционная биопсия имеет меньше ограничений и позволяет исследовать разные зоны печени на разной глубине: производится иглой Менгини (чрескожная в VIII – IX межреберье по правой среднеподмышечной линии).

Чтобы исследователь мог дать ответственное заключение, образец ткани должен быть длиной не менее 2 см и содержать четыре портальных тракта.

Большая часть патологии не была онкогенной природы, а связана с другими заболеваниями печени. Жировой гепатоз обнаружен в 1107 (17 %) образцах (рис.3). Исходом жирового гепатоза является цирроз печени.

Цирроз печени является наиболее частой патологией – 3415 (52 %). Данное заболевание чаще всего ассоциировано с наличием в организме вируса гепатита В или С.

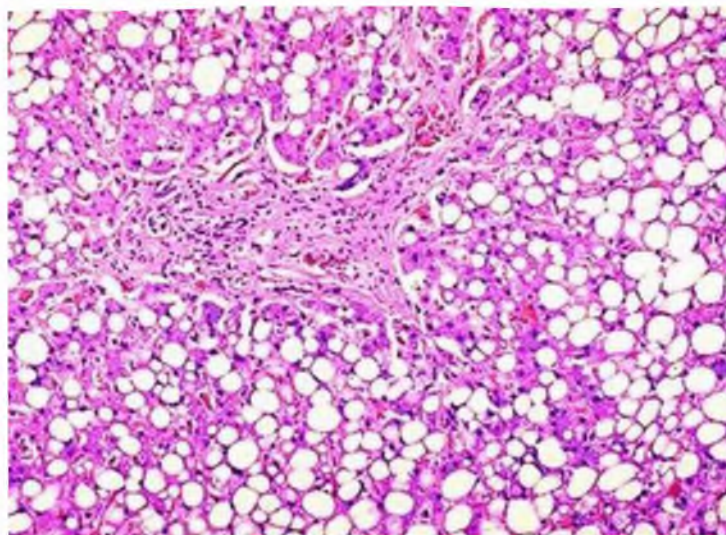


*Рисунок 3. Жировой гепатоз печени. Окраска гематоксилином и
эозином. x 100*

Чаще всего отмечается портальный цирроз. Для которого характерны следующие признаки: нормальное строение печени нарушено, видны мелкие мономорфные узлы-регенераты (ложные дольки), разделенные узкими прослойками соединительной ткани, гепатоциты в состоянии жировой и баллонной дистрофии, в септах обнаруживается инфильтрат, состоящий из полиморфноядерных лейкоцитов, лимфоцитов и макрофагов, пролиферация желчных протоков (рис. 4).

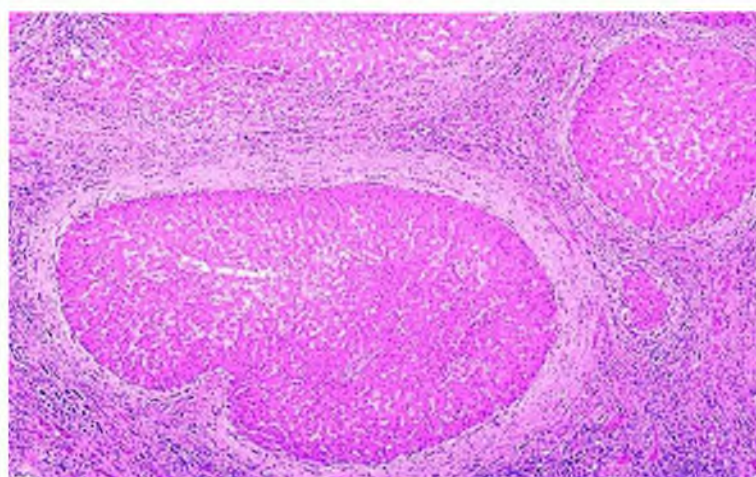


*Рисунок 4. Портальный цирроз печени. Окраска гематоксилином и
эозином. x 40*

Существуют косвенные морфологические признаки присутствия HBsAg в клетке – «матовостекловидные гепатоциты» (рис. 5), а также HBcAg – «песочные ядра» (мелкие эозинофильные включения в ядрах).

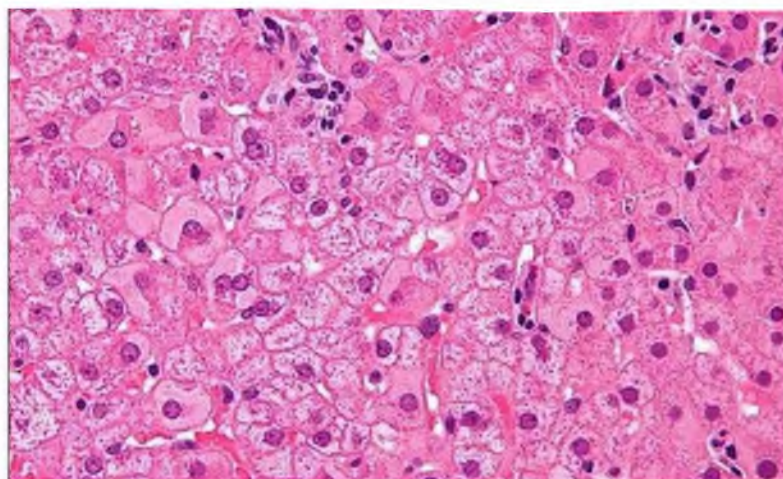


Рисунок 5. «Матовостекловидные» гепатоциты при гепатите В.

Окраска гематоксилином и эозином. x 200

При картине острого вирусного гепатита наблюдаются некрозы гепатоцитов (ступенчатые, мостовидные), гидропическая и баллонная дистрофия гепатоцитов, тельца Каунсильмена (апоптоз гепатоцитов), в портальных трактах и в дольковой строме выявляется обильная инфильтрация, представленная преимущественно лимфоцитами и макрофагами, гиперплазия и очаговая пролиферация купфферовских клеток, встречаются регенерирующие гепатоциты, возможен холестаз (рис. 6). Данное заболевание было установлено по 1213 (18 %) образцам.

Хронический вирусный гепатит характеризуется гидропической и баллонной дистрофией гепатоцитов, жировой дистрофией гепатоцитов (только при ХВГ С), наличием апоптозных телец (тельца Каунсильмена), ступенчатыми и мостовидными некрозами гепатоцитов (при умеренной и высокой активности ХГ), лимфо-макрофагальной инфильтрацией в портальных трактах (при минимальной активности ХГ), распространением

лимфо-макрофагального инфильтрата через пограничную пластинку в печеночную дольку (при высокой активности ХГ) (рис. 7).

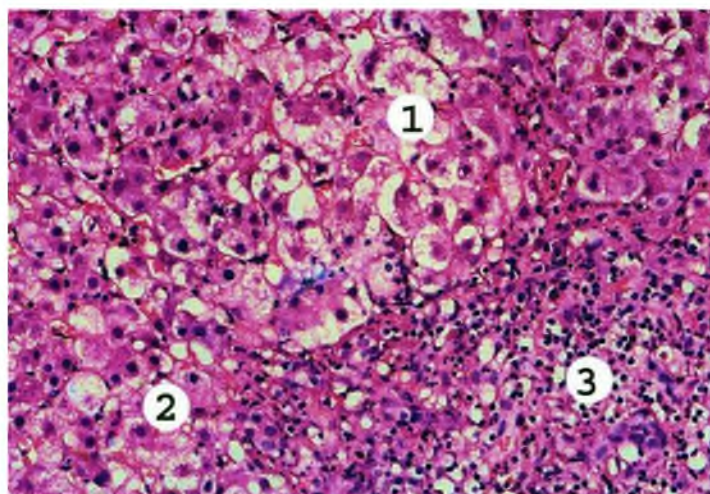


Рисунок 6. Картина острого воспаления печени. Окраска гематоксилином и эозином. х 200

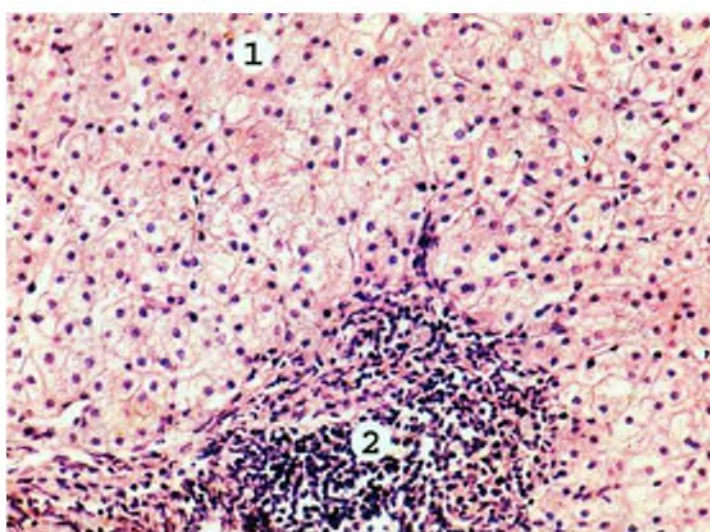


Рисунок 7. Картина ХВГ. Окраска гематоксилином и эозином. х 100

Довольно часто на гистологических образцах наблюдаются признаки вторичного поражения печени за счет метастаз – 755 (11 %) (рис. 8).

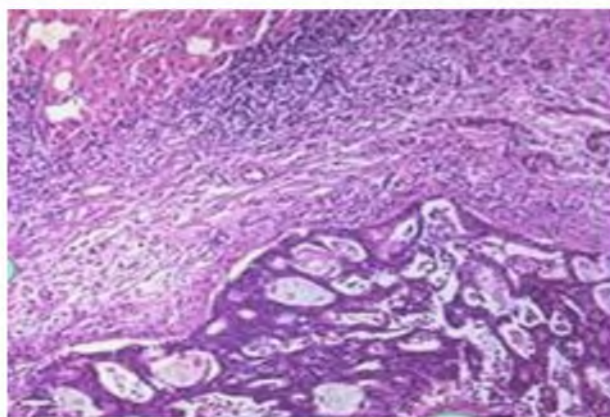


Рисунок 8. Метастазы аденокарциномы в печени. Окраска гематоксилином и эозином. x 100

Первичный рак печени за исследуемый период был обнаружен в 133 (2 %) образцах. 126 образцов были посмертным материалом и 7 это биоптат пациентов.

Опухолевые клетки более крупные, чем гепатоциты, с обильной эозинофильной цитоплазмой. Клетки образуют двух-, трех- или многоядерные трабекулы и тяжи. Между ними встречаются синусоиды, иногда желчные капилляры. В ткани опухоли постоянно обнаруживаются участки некроза, кровоизлияния, иногда холестазы (рис. 9). Анализ соотношения заболеваний печени по результатам гистологического метода представлен на рисунке 10.

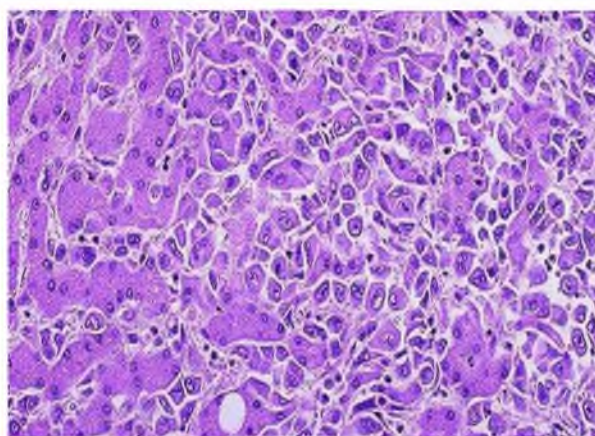


Рисунок 9. ГЦР. Окраска гематоксилином и эозином. x 200

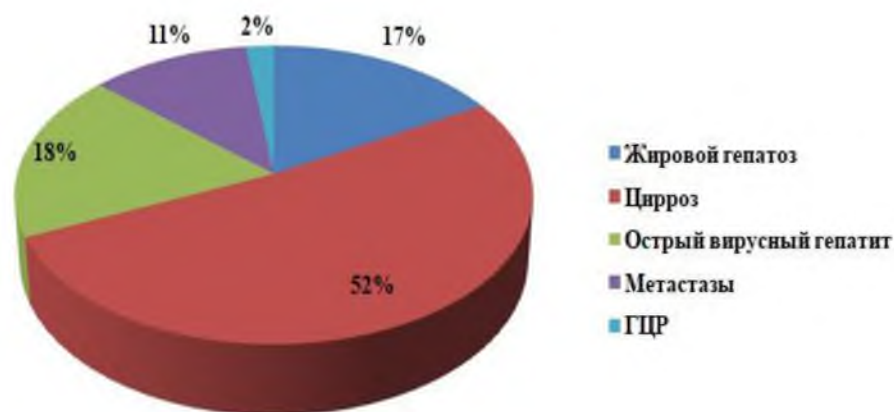


Рисунок 10. Соотношение заболеваний печени по результатам гистологического метода, %

3.2 Результаты гистоцитохимических исследований

Для дифференциальной диагностики первичного и вторичного рака, а так же других заболеваний печени все чаще используют наиболее современные методы. Иммуногистологический анализ образца тонкоигольной биопсии исследуют на гепатоцитарный маркер (Hep Par-1).

Всего данные анализы были описаны у 10 пациентов с подозрением на злокачественные образования печени. В 8 случаях ГЦХ были подтверждены исследованием гепатоцитарного маркера Hep Par-1 (рис. 11). Два результата были отрицательны, в дальнейшем были подтверждены метастазы печени и диагностирован рак поджелудочной железы.

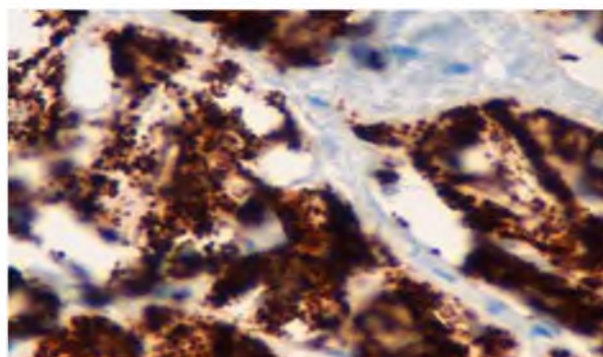


Рисунок 11. Низкодифференцированная гепатоцеллюлярная карцинома. Иммуногистохимическое типирование с MKAT Hep Par 1, X300

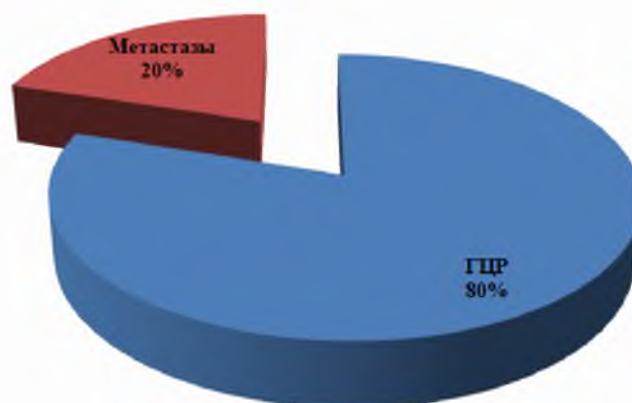


Рисунок 12. Соотношение первичных и вторичных опухолей печени, %

3.3. Результаты биохимических исследований

Всего было исследовано 6396 результата анализа на биохимические показатели. Основным риском озлакачествления заболеваний печени является сопряженность с вирусными заболеваниями. Потому ключевым моментов в диагностики являются методы биохимического исследования крови на наличие антител вируса гепатита В и С. Так же для функциональной оценки состояния органа анализировались следующие показатели: АСТ, АЛТ, ЩФ, ГГТ, карбогидратный антиген 19-9 (CA-19), раковоэмбриональный антиген (РЭА) и α -фетопротеин (АФП).

По результатам исследований на наличие антител к гепатиту В (Anti-HBs) было установлено, что у 274 (26 %) пациентов результат положителен (референсные значения 0–10 мМЕ/мл.). А по результатам анализа крови на Anti-HCV выявлено 798 (74 %) носителей вируса гепатита С (рис. 13).

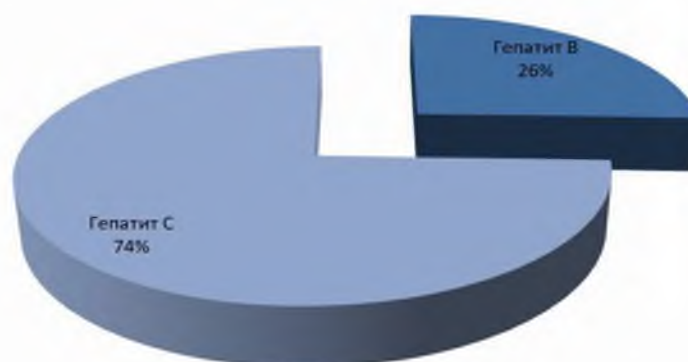


Рисунок 13. Соотношение выявленных вирусных заболеваний, %

Так же были проанализированы данные активности аспартатаминотрансферазы (АСТ). Чрезмерно высокая активность АСТ (более чем в 10 раз больше нормы) обычно вызвана вирусными инфекциями.

Также она может значительно увеличиваться в результате приема лекарств или иных веществ, которые являются токсичными для печени, а также из-за болезней, замедляющих приток крови к печени (ишемии).

При хроническом гепатите активность АСТ обычно превышает норму не более чем в 4 раза. Она колеблется между нормальной и несколько повышенной, поэтому часто для выяснения степени заболевания и назначается анализ. Такие заболевания, как непроходимость желчных путей, цирроз и некоторые виды рака печени способствуют умеренному повышению АСТ. После перенесенного инфаркта и при повреждении мышц активность АСТ также может повышаться, обычно намного больше АЛТ.

Референсные значения:

- мужчины > 18 лет - < 40 Ед/л
- женщины > 18 лет - < 32 Ед/л

Были проанализированы результаты анализов 1202 людей с подозрением на вирусные заболевания (гепатит В, С) и другие заболевания печени. Большинство – 891 результат были выше референсных значений (320 – 450 Ед/л) в несколько раз, что соответствует функциональным нарушениям печени при остром гепатите В и С или при мононуклеозе. Менее выраженные результаты были выявлены в – 297 (100 – 320 Ед/л) могут соответствовать не острой, а хронической форме заболевания печени. Небольшое количество проб было с нормальным уровнем АСТ (0,5 – 41 Ед/л) – 95 проб (рис. 14).

АЛТ относится к классу ферментов-трансфераз, которые участвуют в переносе определенных химических молекул, катализируя тем самым биохимические процессы.

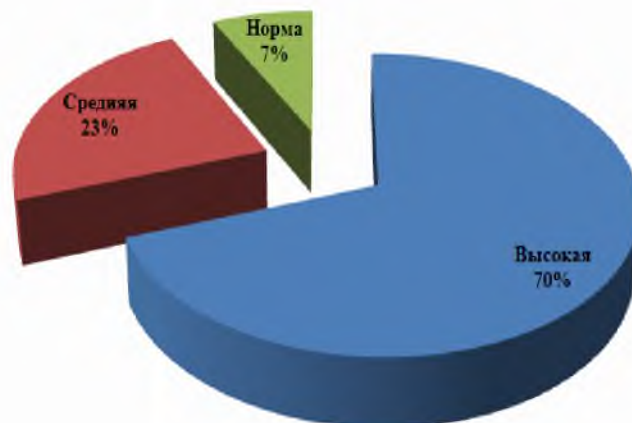


Рисунок 14. Активность АСТ, %

Нормальный уровень и активность АЛТ крайне важны в орнитинном цикле, главной задачей которого является образование нетоксичной мочевины из аммиака. В норме активность АЛТ в крови очень низкая. При проблемах с печенью фермент высвобождается в кровоток обычно еще до появления таких характерных симптомов, как желтуха. В связи с этим АЛТ часто используется как показатель повреждения печени. На основании высокого уровня АЛТ выставляется лабораторный диагноз цитолитического синдрома, который характеризует поражение печени с разрушением целостности ее мембраны и попаданием в кровь внутриклеточных ферментов. При этом АЛТ является более специфичным для диагностики печеночных патологий, чем АСТ. Для мониторинга состояния пациента с патологией гепатобилиарного тракта более целесообразно определять уровень АЛТ в динамике.

Референсные значения:

- мужчины > 18 лет - < 41 Ед/л
- женщины > 18 лет - < 33 Ед/л

Были проанализированы результаты анализов 1 198 людей с подозрением на вирусные заболевания (гепатит В, С) и другие заболевания печени, в том числе онкологические. Большинство – 973 результата были выше референсных значений (330 – 470 Ед/л) в несколько раз, что

соответствует функциональным нарушениям печени при остром гепатите В и С или при мононуклеозе. Менее выраженные результаты были выявлены в – 218 (100 – 320 Ед/л) могут соответствовать не острой, а хронической форме заболевания печени. Небольшое количество проб было с нормальным уровнем АЛТ (0,1 – 41 Ед/л) – 7 проб (рис. 15).



Рисунок 15. Активность АЛТ, %

Щелочная фосфатаза – это группа ферментов, присутствующих почти во всех тканях, но особенно в печени, костях и плаценте. Эти ферменты отщепляют фосфорную кислоту от органических соединений. Ее активность в крови повышается при повреждении печени, костей, почек и других органов. В норме фермент содержится в клетках печени и желчных протоков, участвуя в биохимических реакциях, а в кровь попадает при их разрушении. Умеренная активность в крови – норма из-за естественного обновления клеток, но при массовой гибели клеток уровень резко растет.

Желчь производится в печени и поступает в кишечник через систему желчных протоков, помогая переваривать жиры и выводить некоторые лекарства. Она выделяется во время еды, а в перерывах накапливается в желчном пузыре. Если отток желчи нарушен (например, из-за камней или опухолей), активность щелочной фосфатазы значительно повышается – это состояние называется холестазом.

В костях фермент вырабатывается остеобластами – клетками, формирующими костную ткань. Поэтому его уровень высок у детей и после переломов. Анализ на щелочную фосфатазу используют для диагностики болезней печени, костей и закупорки желчных путей. Его часто сочетают с тестом на гамма-глутамилтрансферазу для выявления патологий желчевыводящих путей, таких как первичный билиарный цирроз и склерозирующий холангит.

Референсные значения:

- Женщины > 18 лет - 35–105 Ед/л
- Мужчины > 18 лет - 40–130 Ед/л

Были проанализированы результаты анализов 1 278 людей. По результатам исследований в большинстве – 1035 пробе выявлено повышение уровня общей щелочной фосфатазы (105–230 Ед/л), что может быть связано с различной степенью функциональных нарушений печени из-за вирусного гепатита или же фиброзов и циррозов печени или онкологии. Незначительное повышение было выявлено в 237 образце (105– 135 Ед/л). В 6 пробах не выявлено повышение ЩФ, результаты в пределах референсных значений (рис. 16).

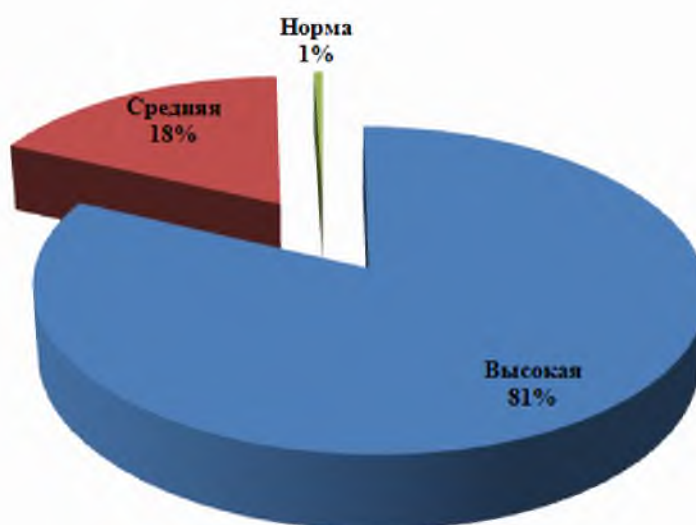


Рисунок 16. Активность ЩФ, %

Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ)– фермент (белок) печени и поджелудочной железы, активность которого в крови повышается при заболеваниях печени и злоупотреблении алкоголем. Гамма-глутамилтранспептидаза – фермент, который находится в клетках печени и желчевыводящих путей и является катализатором определенных биохимических реакций. В кровеносном русле она не содержится, только в клетках, при разрушении которых их содержимое попадает в кровь. В норме часть клеток обновляется, поэтому в крови обнаруживается определенная активность ГГТ. Если гибнет много клеток, ее активность может повышаться значительно.

Тест на ГГТ – самый чувствительный анализ в отношении застоя желчи – холестаза. Активность ГГТ при препятствии оттоку желчи, например при камнях в желчных протоках, повышается раньше, чем активность щелочной фосфатазы. Однако повышение это неспецифично, так как оно происходит при большинстве острых заболеваний печени и желчных ходов, например при остром вирусном гепатите или раке и даже при метастазировании печени в следствии онкологических заболеваний других органов.

В отличие от других печеночных ферментов, производство ГГТ "запускается" алкоголем, поэтому у лиц, злоупотребляющих им, ее активность может быть повышена даже при отсутствии заболевания печени. Кроме того, выработка ГГТ стимулируется некоторыми лекарствами, включая фенobarбитал и парацетамол, поэтому на фоне их приема можно ожидать повышения ГГТ без повреждения печени.

ГГТ также содержится в почках, селезенке, поджелудочной железе, головном мозге, простате, и увеличение ее активности неспецифично только для нарушений печени.

Референсные значения:

- Женщины > 18 лет - 6 – 42 Ед/л
- Мужчины > 18 лет - 10 – 71 Ед/л

Были проанализированы результаты анализов 988 людей. По результатам исследований в большинстве – 752 пробе выявлено повышение уровня общей ГГТ (>80 Ед/л), что может быть связано с различной степенью функциональных нарушений печени из-за вирусного гепатита или же алкогольной болезни печени или онкологии или же метастаз рака других органов. Незначительное повышение было выявлено в 231 образце (>50 Ед/л). В 5 пробах не выявлено повышение ГГТ, результаты в пределах референсных значений (≤ 20 Ед/л) (рис. 17).

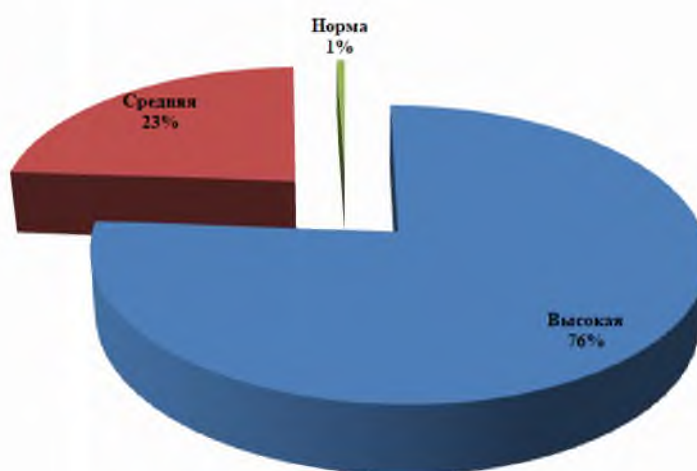


Рисунок 17. Активность ГГТ, %

Раковый антиген СА 19-9 – это высокомолекулярный гликопротеин, который в норме вырабатывается клетками эпителия желудочно-кишечного тракта. Его уровень повышается практически у всех пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта, особенно поджелудочной железы. Продуцируясь опухолевыми клетками, СА 19-9 поступает в кровоток, что делает его эффективным маркером опухоли, позволяющим следить за течением заболевания.

Уровень онкомаркера СА 19-9 повышен у 70 % пациентов с раком поджелудочной железы.

Может увеличиваться его концентрация и при опухолях других локализаций (колоректальном раке, раке печени, желудка, желчного пузыря

или желчных путей, яичников), в меньшей степени повышается при заболеваниях печени (гепатите, циррозе), желчнокаменной болезни, панкреатите, муковисцидозе.

Тест на СА 19-9 не используется для первичной диагностики рака, так как не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью.

Умеренное повышение (до 100–200 Ед/мл) чаще связано с доброкачественными процессами.

Высокие значения (> 500 – 1000 Ед/мл) повышают вероятность злокачественного процесса.

Были проанализированы результаты анализов 300 людей. В небольшом количестве проб – 23 пробы было выявлено значительное превышение референсных значений (> 500 Ед/мл), что скорее связано с онкологическими заболеваниями ЖКТ. В 125 пробах было отмечено небольшое повышение (до 200 Ед/мл), что соотносимо с заболеваниями печени такими как цирроз или гепатит В, С. У большинства (152 образцов) не отмечено превышения референсных значений, это может означать отсутствие серьезных патологий печени или же раннюю стадию заболевания (рис 18).

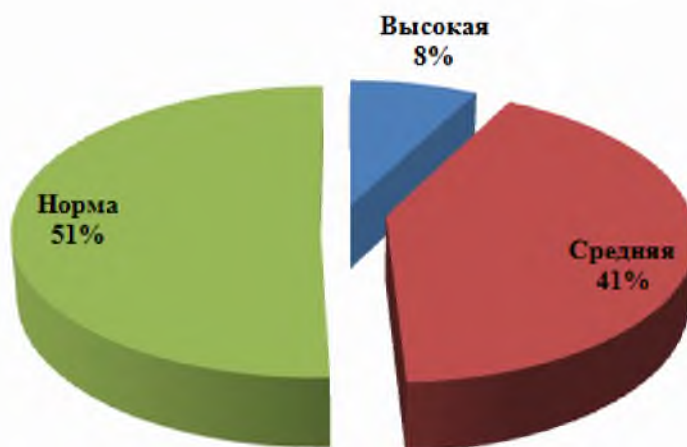


Рисунок 18. Уровень активности СА 19-9, %

Раковый эмбриональный антиген (РЭА) – это разновидность белков

нормальных тканей, которая у здорового человека в очень малых количествах вырабатывается в клетках некоторых внутренних органов. По химической структуре РЭА представляет собой соединение белка и углеводов (гликопротеин). Его предназначение у взрослых неизвестно, а в период внутриутробного развития он интенсивно синтезируется в органах желудочно-кишечного тракта и выполняет важные функции, связанные со стимуляцией размножения клеток. РЭА также обнаруживается в тканях органов пищеварения и у взрослых людей, но в значительно меньшем количестве.

Определение уровня РЭА используется для диагностики ряда злокачественных опухолей, в первую очередь рака толстой и прямой кишки. Если в норме содержание РЭА очень низкое, то при онкологическом процессе оно резко возрастает и может достигать очень больших значений. В связи с этим его относят к тканевым маркерам онкологических заболеваний, или онкомаркерам.

Однако повышение РЭА характерно не только для злокачественного процесса – его продукция может усиливаться при различных воспалительных, аутоиммунных и других доброкачественных заболеваниях внутренних органов.

Название этого онкомаркера – раковый эмбриональный антиген – отчасти отражает его биологическую природу, но в большей степени те свойства, которые являются ценными для лабораторного исследования. "Раковый" относится к его использованию для диагностики рака. Определение "эмбриональный" связано с физиологическими функциями РЭА в период внутриутробного развития человека. Слово "антиген" указывает на возможность его идентификации в биологических средах с помощью иммунохимического анализа (связывания антигена с антителом), в то время как в организме он не проявляет каких-либо антигенных свойств.

Анализ на РЭА применяется для ранней диагностики, наблюдения за течением заболевания и контроля за результатами его лечения при некоторых

опухолях, в первую очередь если это рак толстого кишечника и прямой кишки – при них тест обладает наибольшей чувствительностью, что позволяет использовать его в первичной диагностике.

Кроме опухоли толстого кишечника и прямой кишки, РЭА может повышаться при раке желудка, поджелудочной, молочной железы, легких, простаты, яичников, метастазах рака различного происхождения в печень и кости, хотя при этих состояниях чувствительность метода существенно ниже. Помимо первичной диагностики рака, тест на РЭА используется для контроля за результатами его лечения. После успешной операции по удалению всего объема опухолевой ткани уровень РЭА возвращается к норме максимум в течение двух месяцев. В дальнейшем регулярные анализы помогают контролировать состояние пациента после лечения. Выявление повышенного уровня РЭА на ранних сроках позволяет вовремя обнаружить рецидив заболевания.

Анализ на РЭА также используется в целях контроля эффективности терапии злокачественных процессов. Снижение уровня РЭА в крови в течение курса процедур или после него свидетельствует о положительном результате проводимого лечения.

Тем не менее данный тест не является абсолютно специфичным для опухолей. РЭА может незначительно повышаться и при многих заболеваниях внутренних органов воспалительного и другого (доброкачественного) характера. Его концентрация немного увеличивается у 20-50 % больных с доброкачественными заболеваниями кишечника, поджелудочной железы, печени и легких, а также при циррозах печени, хронических гепатитах, панкреатитах, язвенных колитах, болезни Крона, пневмонии, бронхитах, туберкулезе, эмфиземе, муковисцидозе и аутоиммунных заболеваниях. Показатель повышается при обострении болезни, но в случае улучшения самочувствия возвращается к норме. При злокачественном же процессе уровень РЭА неуклонно растет на протяжении всего периода заболевания.

Референсные значения:

- Женщины (старше 20 лет) < 3,3 нг/мл
- Мужчины (старше 20 лет) < 5,2 нг/мл
- Для некурящих: < 3,8–5,2 нг/мл
 - Для курящих: < 5,5–6,5 нг/мл

Били изучены результаты анализов 211 человека. В 19 пробах было выявлено значительное превышение референсных значений(> 350 нг/мл), что скорее связано с онкологическими заболеваниями ЖКТ, в частности с раком печени или метастазами в ней. В 126 пробах было отмечено небольшое повышение (до 68 нг/мл), что соотносимо с заболеваниями печени такими как цирроз или гепатит В, С. В 66 пробах не отмечено превышения референсных значений, это может означать отсутствие серьезных патологий печени или же раннюю стадию заболевания (рис. 19).

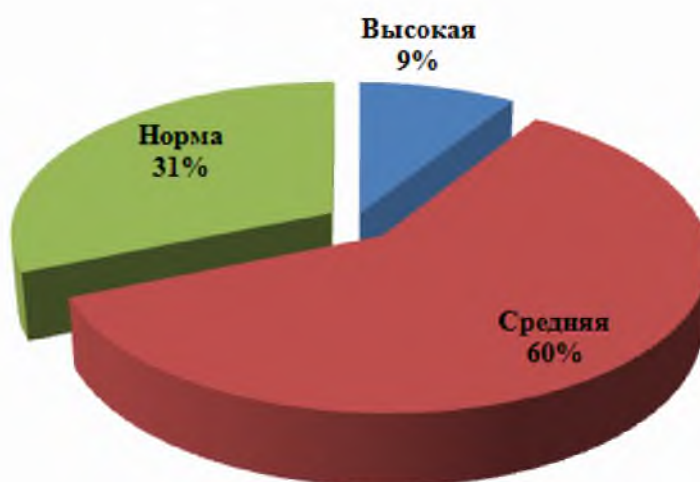


Рисунок 19. Активность РЭА, %

Альфа-фетопроtein – гликопротеин, который вырабатывается в эмбриональном желточном мешке, печени и эпителии кишечника плода. Альфа-фетопроtein принимает активное участие в полноценном развитии плода, и его уровень должен соответствовать гестационному возрасту (возрасту плода с момента оплодотворения).

В организме взрослого человека альфа-фетопrotein отсутствует или обнаруживается в минимальных количествах. Умеренное повышение его уровня может быть вызвано патологией печени, а значительное – низкодифференцированной опухолью – это связано с тем, что некоторые раковые новообразования приобретают свойства эмбриональных тканей и, соответственно, способность к синтезу белков, которые характерны для ранних этапов развития организма. Резкое повышение АФП преимущественно выявляется при раке печени и половых желез.

При первичной гепатоцеллюлярной карциноме повышение АФП у половины больных можно обнаружить на 1–3 месяца раньше клинических проявлений заболевания. Хотя размеры опухоли, интенсивность роста, стадия процесса и степень злокачественности не пропорциональны количеству альфа-фетопroteinа в крови. При прогрессирующей герминогенной несеминоме (опухоли половых желез) определение уровня АФП и хорионического гонадотропина является важным для оценки шансов выживания больных.

Референсные значения:

- Мужчины и небеременные женщины: $< 7-10$ МЕ/мл.

При анализе данных мы удостоверились, что в выборке нет беременных женщин.

Были проанализированы 147 проб. Пробы с уровнем АФП > 400 МЕ/мл, которые могут свидетельствовать об онкологических заболеваниях ЖКТ или метастаз был отмечен в 13 пробах. Еще в 6 пробах было отмечено незначительное до 100–200 МЕ/мл превышение референсных значений, причиной такого повышения могут быть доброкачественные образования печени. В остальных – 128 пробах АФП не превышает норму или отсутствует (рис. 20).



Рисунок 20. Активность Альфа-фетопротейна, %

3.4 Анализ эффективности гистологических, иммуногистохимических и биохимических методов диагностики

На последнем этапе нашей работы стояла задача сравнить эффективность разных методик.

Стоит отметить, что в диагностике онкологических и неонкологических заболеваний печени особая роль принадлежит биохимическим методам исследования, так как они могут дать подробную характеристику функциональному состоянию печени и помочь спрогнозировать развитие более серьезных последствий.

Методы биохимии особенно важны при оценке функционального состояния органа (АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ). Но так же отлично показывают себя при дифференциальной диагностике. Анализ на специфические онкомаркеры (СА 19-9, РЭА, АФП) могут помочь в установлении первичного рака печени. Преимуществами метода являются его малая инвазивность (анализ крови) и скорость получения результатов. Роль биохимических методов очень высока в скрининговых и мониторинговых исследованиях и незаменимы при ранней диагностике, так как наиболее агрессивные формы рака печени ассоциированы с вирусом гепатита В, С. К недостаткам методов можно отнести то, что они имеют низкую специфичность (например, АФП повышен и при циррозе) и не позволяют точно определить тип опухоли.

Гистологический метод очень важен для диагностики заболеваний печени, так как с его помощью можно установить тип опухоли и степень ее злокачественности или отличить процессы метастазирования от первичного

рака.

К основным недостаткам можно отнести то, что метод инвазивный и есть риск развития осложнений (кровотечение, диссеминация опухоли). Так же в данной методике есть зависимость от квалификации специалиста который проводит забор материала, а так же рассматривает и описывает гистологический препарат.

Иммуногистохимический метод может быть перспективен для уточнения гистологического диагноза. С помощью данного метода можно достаточно точно определить происхождение опухоли.

Из-за своей дороговизны метод не так широко распространен. И так же как и обычная гистология инвазивен, а это может повышать риск осложнений.

Из работы следует, что дифференциальная диагностика онкологических заболеваний печени требует комплексного подхода. Гистология с ИГХ подтверждает тип опухоли, биохимические маркеры помогают в скрининге, а иммунологические методы уточняют этиологию (вирусные гепатиты) и прогноз. Интеграция этих методов повышает точность диагностики и позволяет подобрать оптимальную терапию.

Мы сравнили предложенные методы по нескольким критериям, результаты можно видеть в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение диагностических методов дифференциальной диагностики первичного и вторичного рака печени

Критерий	Биохимия	Гистология	Иммуногистохимия
Информативность	Средняя	Высокая	Высокая
Инвазивность	Нет	Да	Да
Специфичность	Низкая	Средняя	Очень высокая
Применение	Скрининг, мониторинг	Основная диагностика	Уточнение диагноза

ВЫВОДЫ

1. Рак печени представляет собой серьезную онкологическую проблему, включая как первичные, так и вторичные метастатические поражения. Первичные злокачественные опухоли печени представляют собой гетерогенную группу новообразований, развивающихся из различных структур печеночной паренхимы. Наибольшую клиническую значимость среди них имеет гепатоцеллюлярный рак (ГЦР), составляющий около 85% всех случаев первичного рака печени. Этиология ГЦР тесно связана с хроническими вирусными. При этом гепатит В ответственен за 50-55% случаев, а гепатит С – за 25-30%. Реже встречаются другие формы первичного рака печени. Холангиокарциномы, развивающиеся из эпителия желчных протоков, составляют до 15% случаев и подразделяются на мелкопротоковые и крупнопротоковые варианты.

2. В условиях лаборатории было проанализировано 75 образцов прижизненных биопсий и 6548 образца посмертного материала, собранного в период с 2024 по 2025 гг. Первичный рак печени за исследуемый период был обнаружен в 133 (2 %) образцах. 126 образцов были посмертным материалом и 7 это биоптат пациентов. Довольно часто на гистологических образцах наблюдаются признаки вторичного поражения печени за счет метостаз – 755 (11 %).

3. Всего было исследовано 6396 результатов анализов на биохимические показатели. Исследований на наличие антител к гепатиту В у 274 (26 %) пациентов результат был положителен, а гепатит С выявлен у 798 (74 %) пациентов. Уровень АСТ был проанализирован у 1202 людей. Большинство – 891 (70 %) были выше референсных значений в несколько раз, что соответствует функциональным нарушениям печени при остром гепатите В и С или при мононуклеозе. В – 297 (23 %) случаях выявлено средний уровень повышения значений, что может соответствовать хронической форме заболевания печени. АЛТ является более специфичным

для диагностики печеночных патологий, чем АСТ. Уровень АЛТ был проанализирован у 1 198 людей. У 973 (81 %) человек результаты были выше референсных значений. Менее выраженные результаты были выявлены в – 218 (18 %) образцах. Активность ЩФ в крови повышается при повреждении печени, костей, почек и других органов. Проанализированы 1 278 результатов исследований. в 1035 (81 %) пробе выявлено повышение уровня общей щелочной фосфатазы, что может быть связано с различной степенью функциональных нарушений печени из-за вирусного гепатита или же фиброзов и циррозов печени или онкологии. Незначительное повышение было выявлено в 237 (18 %) образце. ГГТ – фермент (белок) печени и поджелудочной железы, активность которого в крови повышается при заболеваниях печени и злоупотреблении алкоголем. Проанализированы результаты анализов 988 людей, в 752 (76 %) пробе выявлено повышение уровня общей ГГТ. Незначительное повышение было выявлено в 231 (23 %) образце. Уровень СА 19-9 повышается практически у всех пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта. В 23 (8 %) пробах было выявлено повышение уровня СА 19-9, что скорее связано с онкологическими заболеваниями ЖКТ. В 125 (41 %) пробах было отмечено небольшое повышение, что соотносимо с заболеваниями печени такими как цирроз или гепатит В, С. Анализ на РЭА используется в целях контроля эффективности терапии злокачественных процессов. Из 211 результатов анализов, в 19 (9 %) пробах было выявлено значительное превышение референсных значений, что скорее связано с онкологическими заболеваниями ЖКТ, в частности с раком печени или метастазами в ней. В 126 (60 %) пробах было отмечено небольшое повышение. Резкое повышение АФП преимущественно выявляется при раке печени и половых желез. Были проанализированы 147 проб. Пробы с высоким уровнем АФП – 13 (9 %). В 6 (4 %) пробах – незначительное превышение.

4. Мы изучили 10 результатов анализов полученных иммуногистохимическим методом у пациентов с подозрением на

злокачественные образования печени. В 8 (80 %) случаях исследованием гепатоцитарного маркера Her Pag-1 был подтвержден ГЦР.

5. В диагностике онкологических и неонкологических заболеваний печени важная роль принадлежит биохимическим методам исследования, так как они могут дать подробную характеристику функциональному состоянию печени. К недостаткам биохимических методов можно отнести то, что они имеют низкую специфичность (например, АФП повышен и при циррозе) и не позволяют точно определить тип опухоли. С помощью гистологического метода можно установить тип опухоли и степень ее злокачественности или отличить процессы метастазирования от первичного рака. Недостатки – инвазивность, риск осложнений, зависимость от квалификации специалиста. Иммуногистохимический метод – перспективен для уточнения гистологического диагноза, можно точно определить происхождение опухоли. Недостаток – дороговизна, инвазивность. Дифференциальная диагностика онкологических заболеваний печени требует комплексного подхода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдышев А.Ш., Багрянцев В.Н., Постановова О.Ю. Современный подход к диагностике и дифференциации первичного и метастатического рака печени // Тихоокеанский медицинский журнал. 2011. № 3 (45). С. 80-82.
2. Акберов Р.Ф., Зогот С.Р., Зыятдинов К.Ш. Гепатоцеллюлярный рак: эпидемиология, лучевая диагностика, современные методы лечения (обзор литературы) // Вестник Чувашского университета. 2013. № 3. С. 330-335.
3. Александрова Г.А., Ахметзянова Р.Р., Голубев Н.А., Кириллова Г.Н., Огрызко Е.В., Оськов Ю.И., Романенко О.И., Харьковская Т.Л., Чумарина В.Ж. Здравоохранение в России 2023. Федеральная служба государственной статистики (Росстат), 2023. С. 1-179.
4. Билалова, А.Р. Клинико-лабораторная характеристика хронических гепатитов и циррозов печени различной этиологии. Архивъ внутренней медицины. 2015. № 2 (22). С. 8-14.
5. Булатова И.А., Щёктова А.П., Насибуллина Н.И., Падучева С.В., Щёкотов В.В. Лабораторные маркеры поражения печени при хроническом гепатите С // Современные технологии в медицине. 2017. №3. С.87-92.
6. Гусарев С.А. Патологоанатомическая характеристика первичного и метастатического рака печени: дис... канд. мед. наук. М., 2006. 141 с.
7. Гусейнов А.З., Гусейнов Т.А. Современная диагностика опухолей печени (Обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий, 2016. № 10 (4), С. 359-377.
8. Диденко В.И. Современные достижения в оценке стеатоза печени. Гастроэнтерология, 2015. № 3 (57), с. 95-98.
9. Долгов В.В., Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика: Национальное руководство. В 2-х томах. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 928 с
10. Жданов, К.В. Вирусные гепатиты. СПб.: Фолиант. 2011. 304 с.

11. Использование лабораторных биомаркеров в диагностике хронического злоупотребления алкоголем / А.В. Хапкина, А.В. Михайлова, Д.М. Илюхина [и др.] // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2019. Вып. 4. С. 45-57.
12. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
13. Кузма Фади, Павлов Ч.С., Усанова А.А. и соавт. Неинвазивные и лабораторные методы диагностики алкогольной болезни печени: литературный обзор. Consilium Medicum. 2017. № 19. 2-32.
14. Кушлинский Н.Е., Любимова Н.В. Опухолевые маркеры. Общая характеристика, клиническое значение и рекомендации по использованию // Лаборатория ЛПУ. 2016. № 8. С. 63-77.
15. Майер, К.П. Гепатит и последствия гепатита. Практич. рук. Пер. с нем. 2-е изд.//М: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 505 с.
16. Минимальные клинические рекомендации европейского общества медицинской онкологии (ESMO) / Гепатоцеллюлярный рак: клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению. М., 2010. 47 с.
17. Мицурина В.М., Терешков Д.В. Непрямые маркеры фиброза печени у пациентов с хроническими вирусными гепатитами В и С // Проблемы здоровья и экологии. 2016. №3 (49). С.24-29.
18. Напалков Н.П. Заболеваемость и смертность от рака основных локализаций 1995 г. // Диагностика и интервенционная радиология опухолей малого таза: доклад на 23-м Европейском семинаре по диагностической и интервенционной радиологии. Обнинск, 1995. 124 с.
19. Невзорова М.С., Чепкасова Н.И., Боталов Н.С. Роль клинико-лабораторных и инструментальных методов в диагностике алкогольного

стеатоза // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 6. С.21-25.

20. Непомнящая Е.М., Шапошников А.В., Юрьева Е.А. Гепатоцеллюлярная карцинома — новые положения классификации ВОЗ 2019, 5-е издание. Архив патологии, 2020. № 82 (6), 36-40.

21. Определение маркеров хронического злоупотребления алкоголем методом капиллярного электрофореза / М.А. Мягкова, В.В. Пушкина, С.Н. Петроченко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 12-9. С. 1640-1643.

22. Опухоли печени : учеб.-метод. пособие / А. В. Прохоров, В. Е. Папок, В. В. Барьяш. М.: БГМУ, 2013. 31 с.

23. Основы гепатологии/Под ред. А.О. Буеверова. М. : Издательский дом «АБВ-пресс». 2022. 408 с.

24. Панченко Л.Ф., Теребилина Н.Н., Пирожков С.В., Наумова Т.А. Иммуноклеточные маркеры фиброза у больных алкогольными заболеваниями печени. «НАРКОЛОГИЯ». 2016. № 6., С. 54-61

25. Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., Цапкова Н.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости, распространенности и смертности до начала программы элиминации инфекции. Инфекционные болезни, 2018, т. 16, № 3, С. 37-45

26. Пименов Н.Н., Чуланов В.П., Комарова С.В., Карандашова И.В., Неверов А.Д., Михайловская Г.В., Долгин В.А., Лебедева Е.Б., Пашкина К.В., Коршунова Г.С. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012. №3. С. 4-10.

27. Подильчак М.Д., Терлецкая Л.М., Винниченко Б.И. Диагностическое значение определения некоторых ферментов сыворотки крови у больных с метастазами рака в печени // Клин. хир. 1983. № 5. С. 31-32.

28. Сухорук, А.А. Цирроз печени как исход хронического гепатита С. Журнал инфектологии. 2014. № 6 (1). С. 67-71.
29. Рак печени (гепатоцеллюлярный). Клинические рекомендации Ассоциации онкологов России и Минздрава России. 2022. 48 с.
30. Тельнов В.И., Токарская З.Б., Сурина А.Г. Биохимическая диагностика метастазирования в печень злокачественных опухолей // Биохимия опухолевой клетки: тез. докл. Всес. симп. Минск, 1990. 57 с.
31. Франциянц Е.М., Крылова М.Н. Способ диагностики метастазов в печени // Патент № 2027997–1995.
32. Хронический вирусный гепатит. Под ред. В.В. Серова, З.Г. Апросиной. М: Медицина. 2002. 384 с.
33. Широких А.В., Вялов С.С. Алкогольный стеатоз и хронический алкогольный гепатит: особенности патогенеза и тактика лечения. Consilium Medicum. Гастроэнтерология. (Прил.) 2013. № 01. С. 21-27.
34. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. J Clin Virol; №61. 2014. P. 145-148.
35. Castera, L. Prospective Comparison of Transient Elastography, Fibrotest, APRI, and Liver Biopsy for the Assessment of Fibrosis in Chronic Hepatitis C / L. Castera, J. Vergniol, J. Foucher et al. // Gastroenterology. 2005. Vol. 128. P. 343-350.
36. Higginson, J. Definition and classification of malignant epithelial neoplasms of the liver / J. Higginson, P. E. Steiner // Acta: Unio Internationalis Contra Cancrum. 1961. Vol. 17. P. 593-603.
37. Li D., Mallory T., Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. Clin. Chim. Acta. 2001. 313 (1). P. 15-19.
38. Lohr, H. F. HCV replication in mononuclear cells simulates anti-HCV-secreting B cells and reflects nonresponsiveness to interferon-alfa. J. Med. Virol. 1995. 46(4). P. 314-21.

39. Mivervini M.I., Demetris A.J., Lee R.G. et al. Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors // *Mod. Path.* 1997. Vol. 10. P. 686-692.
40. Nordenstedt, H. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma / H. Nordenstedt, D. L. White, H. B. El-Serag // *Digestive and Liver Disease*. 2010. Vol. 42, suppl. 3. P. 206-214.
41. Qu J., Yang J., Chen M., Cui L., Wang T., Gao W., Tian J., Wei R. (2019) MicroRNA-21 as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Pak. J. Med. Sci.*, 35 (5), P. 1466-1471.
42. Suh, S. W. Predictors of Micrometastases in Patients with Barcelona Clinic Liver Cancer Classification B Hepatocellular Carcinoma / S. W. Suh, Y. S. Choi // *Yonsei Medical Journal*. 2017. Vol. 58 (4). P. 737-742.
43. Wang J., Wang F., Wang N., Zhang M.-Y., Wang H.-Y., Huang G.-L. Diagnostic and prognostic value of protein post-translational modifications in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2023. 11(5), P. 1192-1200.