

**Karol Rogacki**

**Rola komórkowej ekspresji  
 $\beta$ -kateniny i E-kadheryny jako  
markerów progresji zmian  
w przewlekłym zapaleniu wątroby  
typu C**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. med. ALDONA KASPRZAK

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. med. Maciej Zabel

Poznań 2014

*Serdecznie dziękuję mojej Pani Promotor, Prof. dr hab. med. Aldonie Kasprzak z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za wszechstronną pomoc, inspirację naukową i wsparcie merytoryczne oraz niezwykłą życzliwość.*

*Dziękuję również Panu Profesorowi dr hab. med. Maciejowi Zabłowi, Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za stworzenie optymalnych warunków do realizacji badań będących podstawą niniejszej pracy.*

*Składam podziękowania pracownikom i doktorantom Katedry Histologii i Embriologii: Pani dr Wiesławie Przybyszewskiej, Pani dr Joannie Surdyk-Zasadzie, Pani mgr Małgorzacie Andrzejewskiej oraz Pani mgr Elżbiecie Siodła za pomoc w realizacji pracy oraz stworzenie przyjaznej atmosfery w pojmowaniu tajników technik mikroskopowych.*

*Dziękuję również Pani Prof. dr hab. Elżbiecie Kaczmarek, Kierownikowi Zakładu Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej oraz Pani mgr Agnieszce Seraszek-Jaros za nieocenioną pomoc w opracowywaniu morfometrycznych wyników moich badań.*

*Dziękuję również mojej Rodzinie za wsparcie i ciągłą mobilizację.*

Praca została realizowana częściowo z grantu KBN nr 2 PO5A 00829.

<b>SPIS TREŚCI</b>	<b>strona</b>
<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b>	<b>6</b>
<b>WSTĘP</b>	<b>8</b>
1. Budowa wirusa C zapalenia wątroby	10
2. Heterogenność HCV	13
3. Pozawątrobowa lokalizacja HCV	14
4. Cykl życiowy HCV	14
5. Odpowiedź immunologiczna w zakażeniu HCV	16
6. Zmiany morfologiczne w wątrobie w zakażeniu HCV	23
7. Molekularne aspekty włóknienia wątroby w zakażeniu HCV	25
8. Rola białek HCV w wątrobowej onkogenezie	27
9. Szlak sygnałowy Wnt/Frizzled/ $\beta$ -katenina	33
<i>9.1. Kanoniczna ścieżka Wnt/Fzd/<math>\beta</math>-katenina</i>	<i>33</i>
<i>9.1.1. Szlak Wnt/<math>\beta</math>-katenina a hepatokancerogeneza</i>	<i>41</i>
<i>9.1.1.1. Szlak Wnt/<math>\beta</math>-katenina w hepatokancerogenezie na tle zakażenia HCV</i>	<i>45</i>
10. Rola kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina w fizjologii i patologii	46
<i>10.1. Kompleks kadheryna/katenina jako nabłonkowa bariera</i>	<i>46</i>
<i>10.2. Typy połączeń międzykomórkowych w wątrobie</i>	<i>49</i>
<i>10.3. Kompleks kadheryna/katenina i przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (EMT)</i>	<i>50</i>
<i>10.4. Kompleks kadheryna/katenina a włóknienie wątroby</i>	<i>51</i>
<i>10.5. Zaburzenia ekspresji kompleksu kadheryna/katenina a kancerogeneza</i>	<i>52</i>
<b>ZAŁOŻENIA I CELE PRACY</b>	<b>54</b>
<b>MATERIAŁ I METODY</b>	<b>55</b>
<b>PACJENCI</b>	<b>55</b>
Grupa badana	55
Grupa z rakiem pierwotnym wątroby (HCC)	55
Grupa kontrolna (n=8)	56
Badania biochemiczne	56
Badania potwierdzające zakażenie HCV	56
<b>MATERIAŁ TKANKOWY</b>	<b>57</b>
Ocena histopatologiczna bioptatu wątroby w grupie z pzw C	57

Badania mikroskopowe	58
<i>Technika immunocytochemiczna (immunohistochemiczna) (IHC)</i>	58
<i>Technika ImmunoMax</i>	61
<i>Technika hybrydyzacji in situ</i>	62
Półilościowa ocena ekspresji białek	63
Archiwizacja komputerowa obrazów z immunocytochemiczną ekspresją białek	64
Analiza ilościowa reakcji immunocytochemicznej z zastosowaniem metody morfometrycznej	64
Metody statystyczne	67
Zagadnienia etyczne	67
<b>WYNIKI</b>	<b>68</b>
1. Dane kliniczne grupy badanej (pzw C)	68
2. Ocena nasilenia zmian zapalnych ( <i>grading</i> ), stopnia zaawansowania włóknienia ( <i>staging</i> ) oraz stłuszczenia wątroby u pacjentów z pzw C	71
3. Immunocytochemiczna analiza ekspresji białek adhezyjnych	73
3.1. <i>β-katenina</i>	73
3.2. <i>E-kadheryna</i>	78
3.3. <i>Wskaźnik E-kadheryna/β-katenina</i>	80
3.4. <i>N-kadheryna</i>	81
4. Hybrydocytochemiczna analiza ekspresji β-kateniny	83
5. Analiza porównawcza wykrywalności (częstości występowania) białek adhezyjnych w obrębie poszczególnych grup pacjentów	84
5.1. <i>Grupa z pzw C</i>	84
5.2. <i>Grupa HCC</i>	84
5.3. <i>Kontrola</i>	85
6. Analiza morfometryczna nasilenia ekspresji białek adhezyjnych w obrębie poszczególnych grup pacjentów	86
7. Analiza ekspresji białek adhezyjnych w grupie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w zależności od nasilenia zmian zapalnych ( <i>grading</i> ) oraz zaawansowania włóknienia ( <i>staging</i> )	88
8. Porównanie ekspresji białek adhezyjnych u pacjentów z marskością i bez marskości wątroby	89
9. Korelacje między wzajemną ekspresją białek adhezyjnych w badanych grupach	91
10. Tkankowa ekspresja białek adhezyjnych (β-katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) w zależności od komórkowej lokalizacji	93
10.1. <i>β-katenina</i>	93

10.2. <i>E-adheryna</i>	95
10.3. <i>N-kadheryna</i>	96
11. Tkankowa ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych	96
12. Ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a ekspresja białka proliferacyjnego Ki-67 w wątrobie	98
13. Korelacja ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67 z danymi klinicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z pzw C	100
14. Ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a ekspresja cykliny D1 w wątrobie	101
15. Korelacja ekspresji cykliny D1 z danymi klinicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z pzw C	103
16. Ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a ekspresja wimentyny w wątrobie	104
17. Korelacja ekspresji wimentyny z danymi klinicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z pzw C	105
<b>OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja</b>	107
<i>Ekspresja <math>\beta</math>-kateniny</i>	107
<i>Ekspresja E-kadheryny</i>	114
<i>Ekspresja N-kadheryny</i>	120
<i>Ekspresja wimentyny</i>	122
<b>WNIOSKI</b>	125
<b>STRESZCZENIE</b>	126
<b>SUMMARY</b>	130
<b>ANEKS</b>	134
<b>PIŚMIENNICTWO</b>	140
<b>Załącznik – Zgoda Komisji Bioetycznej</b>	

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>aa</b>	( <i>amino acids</i> ) - aminokwasy
<b>AFP</b>	( <i>alpha-fetoprotein</i> ) – alfa-fetoproteina
<b>AKT</b>	( <i>serine/threonine-specific protein kinase</i> ) – kinaza serynowo-treoninowa
<b>ALT</b>	( <i>alanine aminotransferase</i> ) - aminotransferaza alaninowa
<b>AST</b>	( <i>aspartate aminotransferase</i> ) aminotransferaza asparaginianowa
<b>BSA</b>	( <i>bovine serum albumin</i> ) - albumina surowicy wołowej
<b>C protein</b>	( <i>capsid, core HCV protein</i> ) - białko C wirusa HCV
<b>cDNA</b>	( <i>complementary DNA</i> ) - komplementarny DNA
<b>DAB</b>	( <i>3,3'-diaminobenzidine</i> ) - 3,3'-diaminobenzydyna
<b>EGF</b>	( <i>epidermal growth factor</i> ) – naskórkowy czynnik wzrostu
<b>FGF</b>	( <i>fibroblast growth factor</i> ) – czynnik wzrostu fibroblastów
<b>GGTP</b>	( <i>gamma-glutamyl transpeptidase</i> ) - gamma-glutamilo-transpeptydaza
<b>Grb2</b>	( <i>growth factor receptor-binding protein 2</i> ) – białko wiążące GH-R
<b>HCC</b>	( <i>hepatocellular carcinoma</i> ) - pierwotny rak wątrobowokomórkowy
<b>HIV</b>	( <i>human immunodeficiency virus</i> ) – ludzki wirus niedoboru odporności
<b>IL</b>	( <i>interleukin</i> ) - interleukina
<b>JNK</b>	( <i>c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase</i> ) – kinaza białkowa c-Jun na końcu N aktywowana przez stres
<b>LZIP</b>	( <i>leucine zipper transcription factor</i> ) – czynnik transkrypcyjny z “zamkiem” leucynowym
<b>MAPK</b>	( <i>mitogen-activated protein kinase</i> ) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen
<b>mRNA</b>	( <i>messenger RNA</i> ) - informacyjny RNA
<b>NF-κB</b>	( <i>nuclear factor-kappa B</i> ) – czynnik jądrowy kappa B
<b>NS3, NS5A etc.</b>	( <i>nonstructural proteins 3, 5A, etc.</i> ) – białka niestrukturalne HCV
<b>o.u.n.</b>	ośrodkowy układ nerwowy
<b>PBS</b>	( <i>phosphate buffered saline</i> ) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
<b>PCNA</b>	( <i>proliferating cell nuclear antigen</i> ) – jądrowy antygen proliferujących komórek
<b>PCR</b>	( <i>polymerase chain reaction</i> ) – łańcuchowa reakcja polimerazy

<b>PKA/C</b>	<i>(protein kinase A/C)</i> – kinaza białkowa A/C
<b>PI-3K</b>	<i>(phosphatidylinositol 3-kinase)</i> – kinaza 3-fosfatidyloinozytolu
<b>pzw C</b>	przewlekłe zapalenie wątroby typu C
<b>STATs</b>	<i>(signal transducers and activators of transcription family proteins)</i> – rodzina transduktorów sygnału i aktywatorów transkrypcji
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>(transforming growth factor)</i> - transformujący czynnik wzrostu $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>(tumor necrosis factor <math>\alpha</math>)</i> - czynnik martwicy nowotworów $\alpha$
<b>TNFR1</b>	<i>(tumor necrosis factor <math>\alpha</math> type 1 receptor)</i> - receptor typu 1 TNF- $\alpha$

W przypadku powszechnego używania skrótów angielskich w literaturze, zwroty te pozostawiono w oryginalnym brzmieniu.

## WSTĘP

Wirus C zapalenia wątroby (ang. *hepatitis C virus*, HCV) został po raz pierwszy zidentyfikowany technikami biologii molekularnej przez Choo i współpracowników w 1989 roku<sup>1</sup>, choć już wcześniej trwały prace nad wirusami zapalenia wątroby nazwanymi nie-A nie-B. Według Światowej Organizacji Zdrowia szacuje się, że na świecie żyje około 170 milionów ludzi zakażonych tym patogenem. W Polsce zakażonych jest około 1,4% populacji czyli około 750 tysięcy osób<sup>2</sup>. Ze względu na niespecyficzne objawy choroby wiele osób nie wie o zakażeniu i nie jest świadoma powikłań. U ok. 80% z nich rozwinię się przewlekłe zapalenie wątroby i w ciągu wielu lat infekcji w ok. 20% przypadków - marskość wątroby. HCV jest wirusem karcynogennym. U chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (pzw C) u 0,46%, a w rozwiniętej pozapalnej marskości od 1 do 6% przypadków rocznie, rozwinię się pierwotny rak wątroby (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC). W leczeniu pzw C stosuje się skojarzoną terapię pegylovanym interferonem alfa oraz Rybawiryną, jednak skuteczność leczenia w genotypie 1b HCV wynosi jedynie około 50%. Od 2011 roku w terapii zakażonych genotypem 1 stosuje się także inhibitory proteazy serynowej NS3/4A (telaprevir) i NS3 (boceprevir)<sup>3</sup>.

Wirusowe zapalenie wątroby typu C jest podstępłą chorobą przebiegającą najczęściej, bo w ok. 80% przypadków bezobjawowo. Tylko u 15 do 30% nowo zakażonych pacjentów rozwinię się ostre objawy zapalenia wątroby, które są zwykle łagodne. Pojawiają się po 5 do 12 tygodniach i trwają od 2 do 12 tygodni. Najczęściej są to: osłabienie, bóle kostno-mięśniowe, stany podgorączkowe i utrata apetytu. Żółtaczka występuje jedynie u około 10-15% osób zakażonych HCV. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się najczęściej około 10-krotnie wyższą niż w normie, aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT). Bardzo rzadko zakażenie przebiega w postaci piorunującej. U około 15 do 25% chorych następuje spontaniczna eliminacja wirusa i normalizacja aktywności aminotransferaz. Jednak w większości przypadków dochodzi do utrzymywania się wirerii i przeciwciał w surowicy powyżej sześciu miesięcy i rozwoju przewlekłego zakażenia. W trakcie wieloletniej bez- lub skąpoobjawowej infekcji, dominuje uczucie zmęczenia i zmiany depresyjne. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się nieznacznie podwyższone albo prawidłową aktywność aminotransferaz, rzadko podwyższone są wartości  $\gamma$ -glutamilo-transpeptydazy (GGTP), fosfatazy alkalicznej czy bilirubiny.

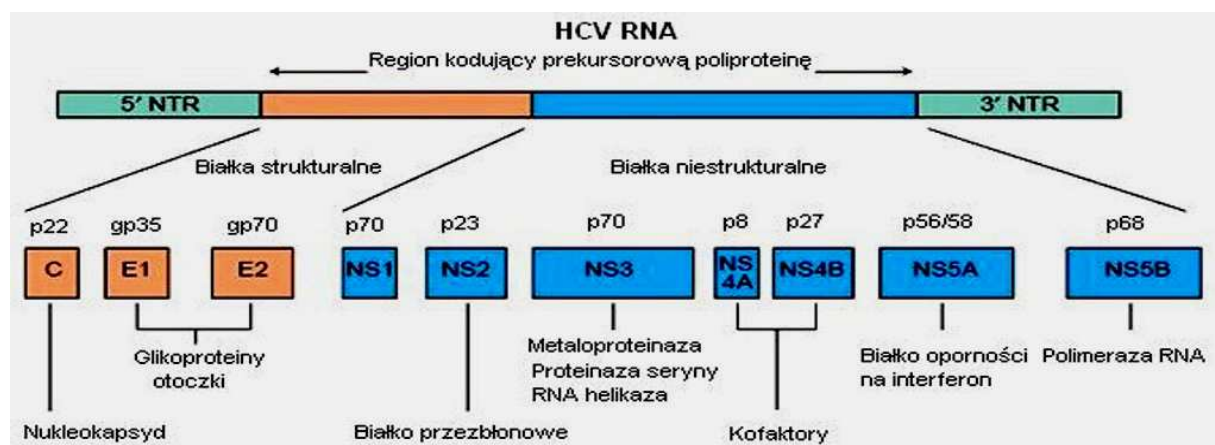


Przeciwciała anti-HCV wykrywane są w teście ELISA po ok. 20 do 150 (średnio 60) dniach od zakażenia. Znane są jednak wyjątkowe przypadki znacznie opóźnionej serokonwersji, a nawet jej brak. Uważa się, że pojawienie się odpowiedzi humoralnej jest opóźnione o ok. 70 dni w stosunku do wirerii. Testem potwierdzającym zakażenie jest wykrywanie RNA wirusa z użyciem metody polimerazowej reakcji łańcuchowej (ang. *polymerase chain reaction*, PCR). Obecność RNA wirusa można wykazać już od 7 do 14 dni po zakażeniu<sup>4,5,6</sup>. U wielu pacjentów występują pozawątrobowe objawy zakażenia. W surowicy części osób zakażonych wirusem można wykryć przeciwciała przeciwtkankowe. Częściej niż u niezakażonych występują towarzyszące choroby z autoagresji. Do najczęstszych zaburzeń immunologicznych należy krioglobulinemia. We krwi znajdują się immunoglobiny precypitujące w obniżonej temperaturze i ponownie rozpuszczające się po podwyższeniu temperatury. Objawy kliniczne krioglobulinemii związane są z zapaleniem drobnych naczyń i wywołane są przez złogi krioglobulin w ich ścianach. Manifestują się jako plamica, osłabienie, bóle stawowe, polineuropatia, uszkodzenie nerek często z zespołem nerczycowym. HCV jako wirus limfotropowy może wywoływać choroby rozrostowe układu chłonnego. U części chorych na chłoniaka nieziarniczego z komórek B w zmienionych nowotworowo komórkach węzłów chłonnych i szpiku stwierdzano RNA HCV. Częstym powikłaniem hematologicznym jest małopłytkowość. U części chorych rozwija się uszkodzenie nerek, szczególnie błoniaste lub błoniasto-rozplamowe zapalenie kłębków nerkowych. Z zakażeniem HCV częściej współistnieją zaburzenia czynności tarczycy z występowaniem przeciwciał przeciwarczycowych. W dużej grupie zakażonych wirusem stwierdza się zespół suchości błon śluzowych jamy ustnej, często ze zmianami zapalnymi w śliniankach o typie nacieku limfocytarnego, niekiedy prowadzące do objawów zespołu Sjögrena. Z zakażeniem HCV często współistnieją takie zmiany skórne jak liszaj płaski, obawy porfirii późnej skórnej, rumień guzowaty, rumień wielopostaciowy, pokrzywka i bielactwo. Objawy neurologiczne związane są z krioglobulinemią. Mogą manifestować się jako polineuropatia obwodowa, rzadziej stany otępienne, porażenia nerwów czaszkowych czy udary mózgu. Sugerowany jest także związek zakażenia HCV z chorobami tkanki łącznej, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie wielomięśniowe. U zakażonych HCV stwierdza się często obecność czynników reumatoidalnych<sup>7</sup>.

## 1. Budowa wirusa C zapalenia wątroby

HCV ma kształt kulisty, posiada otoczkę o średnicy 30-60 nm (średnio 55 nm)<sup>8</sup>. Zaliczany jest do rodziny *Flaviviridae* razem z wirusami z rodzaju *Flavivirus* do których należą: wirus kleszczowego zapalenia mózgu, wirus żółtej febry, wirus gorączki Zachodniego Nilu, wirus dengi oraz rodzaju *Pestivirus* z zaliczanym do niego wirusem biegunki i zapalenia błon śluzowych bydła. HCV jest jedynym przedstawicielem rodzaju *Hepacivirus*<sup>9</sup>.

HCV zbudowany jest z otoczki i rdzenia, w skład którego wchodzi nić RNA oraz białko rdzenia. RNA wirusa jest pojedynczą, dodatnio spolaryzowaną, niepodzielną na segmenty nicią, składającą się z około 9500 nukleotydów. Stanowi pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ang. *open reading frame*, ORF) i koduje białko zwane prekursorową poliproteiną zbudowaną z 3010-3033 aminokwasów (aa). Na obu końcach nici RNA są fragmenty niekodujące, jednak niezbędne do prawidłowej replikacji wirusa. Replikacja zachodzi w strukturach błonowych komórki, a w wyniku enzymatycznego rozszczepienia poliproteiny pierwotnej powstaje co najmniej 10 białek. Są to białka strukturalne i niestrukturalne oraz białko p7 (**Rycina 1**).



Rycina 1. Budowa genomu i białek kodowanych przez HCV (na podstawie<sup>10</sup>, zmodyfikowany; szczegółowy opis w tekście).

Białka strukturalne kodowane są od 342 nukleotydu końca 5' nici RNA, a przesuwając się w kierunku końca 3' kodowane są białka niestrukturalne. Translacja odbywa się w obrębie struktur błonowych siateczki endoplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*, ER). Pierwszym białkiem strukturalnym, powstającym po odszczepieniu od poliproteiny pierwotnej, przy udziale enzymu komórki gospodarza - sygnalazy, jest białko rdzenia (ang. *core*, białko C, białko kapsydowe). Wyróżnia się kilka odmian białka rdzeniowego: jest to białko p21 powstające po rozszczepieniu pomiędzy 191 i 192 aa, p19 (rozszczenie pomiędzy 173 i 174 aa) i składające się ze 151 aa, białko p16. Białko F zawiera zmienną, zależną od genotypu liczbę aminokwasów, są one jednakowe z białkiem rdzenia w zakresie pierwszych dziesięciu, a następnie różnią się w zależności od genotypu wirusa. Białka p21 i p19 znajdują się w obrębie ER, a p16 występuje w jądrze komórki i przypisuje się mu rolę w wiązaniu do znajdujących się tam rybosomów. Liczne hydrofobowe domeny białek p19 i p21 umożliwiają ich łączenie z błoną ER, co warunkuje błonowo-zależne dojrzewanie białek wirusa, uzależnione od występujących tam enzymów. Białka rdzenia posiadają zdolność tworzenia dimerów i polimerów, co umożliwia im budowanie nukleokapsydu dla potomnych wirusów. Oprócz udziału w tworzeniu potomnych wirionów, wpływają na ekspresję genów, w tym onkogenów. Ponadto biorą udział w modulacji systemu odporności przez hamowanie odpowiedzi komórkowej, hamowanie apoptozy i wpływ na sygnalizację cytokinową. Wysoka immunogenność i konserwatywność tych białek została wykorzystana do wykrywania przeciwciał w testach serologicznych<sup>11,12,13</sup>.

Kolejnymi białkami strukturalnymi powstającymi z prekursorowej poliproteiny są białka otoczki E1 i E2 (ang. *envelope*, E), które po odszczepieniu na poziomie 383 i 746 aa są modyfikowane w procesie glikozylacji, dając w końcowej formie glikoproteiny otoczkowe gp31 i gp70. Poza glikozylowaną formą powstają też agregaty białka E2 pozostające w cytozolu i szybko rozkładane w proteasomach. Obie glikoproteiny tworzą kompleksy połączone głównie wiązaniami niekowalencyjnymi, choć znaleziono także kompleksy połączone wiązaniami dwusiarczkowymi. W końcowej postaci powstają jako heterodimerowe kompleksy, z transbłonowymi domenami złożonymi z N końcowej domeny zewnętrznej i C końcowej hydrofobowej kotwicy. Transbłonowe domeny otoczki E1, a zwłaszcza E2 spełniają wielokierunkowe funkcje. Biorą udział w wejściu wirusa do komórki, warunkują zakotwiczenie w błonie ER, zawierają sekwencje sygnałowe odgrywające podstawową rolę w translacji i

subkomórkowej lokalizacji. Fragment C-końcowy bierze udział w asocjacji wirusa z kroplami lipidowymi. W obszarze N-końcowym otoczki E2 zlokalizowany jest region stanowiący hyperzmienną sekwencję HVR1 (ang. *hypervariable region*) z epitopami dla przeciwciał neutralizujących. Pod presją układu immunologicznego dochodzi do szybkich mutacji w tym regionie, a wysoka zmienność genetyczna ochrania wirusa przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza, co jest jednym z elementów umożliwiających przetrwanie zakażenia<sup>11,12,13</sup>. Granicę pomiędzy rejonami strukturalnymi i niestructuralnymi poliproteiny stanowi hydrofobowe białko błonowe p7, składające się z 63 aa. Pełni ono funkcję kanału jonowego, nie bierze aktywnego udziału w procesie replikacji wirusa HCV, ale może być miejscem uchwytu dla leków np. amantadyny<sup>14</sup>.

Białka niestructuralne obejmują proteiny NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B. Białko NS2 stanowi przezbłonowe białko biorące udział w translokacji w świetle ER. Sekwencje NS2 zachodzące na 1/3 sekwencji NS3 kodują metaloproteinazę zależną od jonów cynku powodującą autoproteolityczne rozszczepienie pierwotnej poliproteiny w miejscu NS2 i NS3. Poza funkcją autoproteolityczną i wpływem na proces dojrzewania pozostałych białek NS2, prawdopodobnie jest inhibitorem apoptozy, wpływa na ekspresję komórkowych genów oraz jest niezbędne w procesie fosforylacji NS5A<sup>11,12,13</sup>. Odcinek NS3 poza udziałem w kodowaniu proteazy biorącej razem z odcinkiem NS2 udział w rozszczepieniu w miejscu NS2 i NS3, koduje jeszcze trzy inne białka enzymatyczne - nukleozydotrójfosfatzę - NTP, RNA helikazę oraz proteinazę regionu NS3 seryny. Proteinaza ta razem z białkiem regionu NS4A jako kofaktorem, jest odpowiedzialna za dalsze rozszczepianie poliproteiny pierwotnej w miejscach NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A oraz NS5A-NS5B. RNA-helikaza i NTP-aza biorą bezpośredni udział w replikacji RNA wirusa. Białko NS3 wpływa prawdopodobnie wraz z innymi białkami na proliferację komórkową oraz procesy transformacji i onkogenezy<sup>11,12,13</sup>. Białko NS4A jako hydrofobowe ma prawdopodobnie udział w przyleganiu do błon ER. Jest kofaktorem dla proteazy seryny NS3 i integralną częścią rdzenia enzymu. Białka regionu NS3/4A pełnią ważną rolę w hamowaniu odpowiedzi komórki na zakażenie HCV i mają zdolność proteolitycznej degradacji czynników CARDIF (ang. *caspase recruitment domain inducing IFN-B*) oraz TRIF (ang. *Toll/IL-1 receptor inducing IFN-B*). Blokuje także fosforylację IRF 3 (ang. *Interferon regulatory factor 3*)<sup>15</sup>. Białko NS4B jest również hydrofobowym białkiem błonowym i pełni funkcje w zmianach struktury błon,

odpowiedzialnych za proces replikacji wirusa. Białko NS5A występuje w formie podstawowej i hyperfosforylowanej. Wchodzi w skład kompleksu replikacyjnego, wywiera wpływ modulacyjny na białka NS3, NS4A i NS4B. Zawiera region determinujący wrażliwość na interferon (ang. *Interferon Sensitivity Determining Region, ISDR*). Interakcja RNA-zależnej kinazy białkowej (ang. *protein kinase RNA dependent, PKR*), która jest czynnikiem krytycznym w działaniu przeciwwirusowym interferonu, wraz z ISDR prowadzi do jej blokowania, co uniemożliwia fosforylację eukariotycznego czynnika inicjującego eIF2 $\alpha$  (ang. *Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$* ), a tym samym hamowanie syntezy białek w zakażonej komórce. Mutacja NS5A jest jednym z czynników wpływających na skuteczność leczenia interferonem<sup>13,16</sup>. Białko NS5B hydrofobowym końcem C ulega zakotwiczeniu w komórce i jest RNA-zależną polimerazą RNA (ang. *RNA-dependent RNA polymerase, RdRp*). Bierze udział w replikacji wirusa. Nie ma ona zdolności poprawiania błędów powstających podczas transkrypcji, co prowadzi do częstych zmian genetycznych i powstawania form *quasispecies*, umożliwiając ucieczkę wirusa spod kontroli układu immunologicznego<sup>11,12,13</sup>.

## 2. Heterogenność HCV

HCV charakteryzuje się dużą zmiennością genetyczną. Na podstawie 222 aa białka NS5B można go podzielić według klasyfikacji Simondsa<sup>17</sup> na 6 głównych genotypów (typów) i ponad 100 podtypów. Poszczególne genotypy oznaczają się cyfrą arabską od 1 do 6, a podtypy, małą literą alfabetu łacińskiego dołączoną do cyfry oznaczającej genotyp np. 1a, 2b. Oznaczenie genotypu ma olbrzymie znaczenie ze względu na różną odpowiedź poszczególnych typów wirusa na leczenie, gorsze rokowanie co do skuteczności terapii przeciwwirusowej dotyczy zakażenia genotypem 1 i 4. W zakażeniu genotypem 3 częściej występuje stłuszczenie wątroby. Zmienność genetyczna wirusa utrudnia stworzenie skutecznej szczepionki. Różne jest rozmieszczenie geograficzne poszczególnych genotypów wirusa. Genotypy 1a, 2a i 2b są rozpowszechnione na całym świecie, podczas gdy genotyp 5a występuje najczęściej na obszarze południowej Afryki, typ 6a w Hong Kongu a 4a w Egipcie. W Stanach Zjednoczonych Ameryki i w zachodniej Europie najczęściej rozpowszechniony jest genotyp 1a, 1b, 2a, 2b i 3a<sup>18</sup>. Genotypy 1b i 2a są często związane z zakażeniami szpitalnymi i przetoczeniowymi, natomiast zakażenia genotypem 1a, 3a, 3b i 4 przeważają u uzależnionych od dożylnych środków odurzających<sup>18</sup>.

### 3. Pozawątrobowa lokalizacja HCV

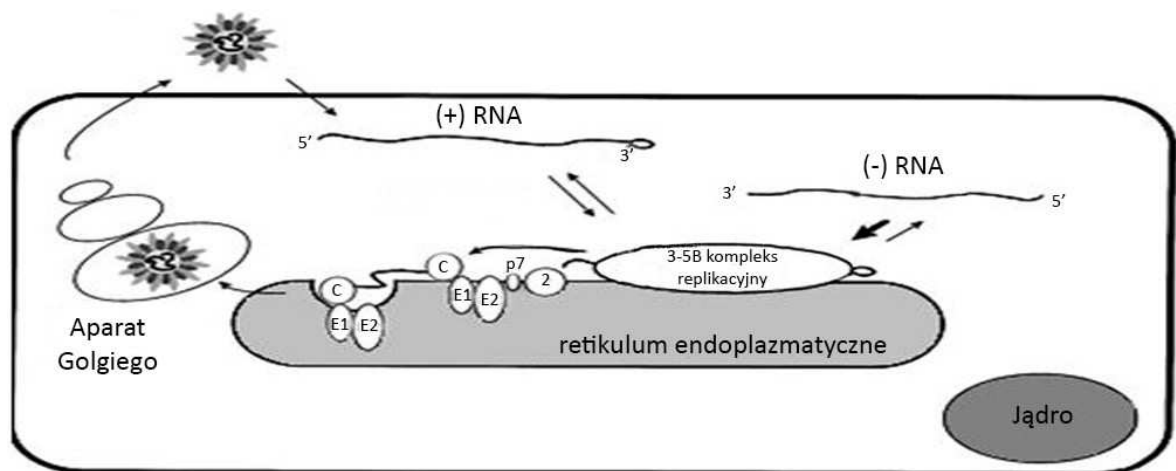
Obecność HCV stwierdzano w komórkach gruczołów dokrewnych, takich jak tarczyca, trzustka, nadnercza, w komórkach o.u.n., substancji białej i szarej półkul mózgowych, rdzenia przedłużonego czy w szpiku kostnym. Sporadycznie wykazywano HCV w śledzionie i komórkach skóry. Szczególne znaczenie ma obecność wirusa w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononucleated cell*, PBMC). Znajdowano w nich ujemną interfazową nić RNA, świadczącą o replikacji wirusa<sup>19</sup>. Jednak namnażanie wirusa odbywa się głównie w komórkach wątroby.

### 4. Cykl życiowy HCV

Pierwszym etapem cyklu życiowego wirusa jest jego wnikięcie do komórki gospodarza. Mechanizm wnikięcia wirusa do komórki nie jest dokładnie poznany, wymaga współdziałania zarówno receptorów komórki gospodarza, jak i wirusa. Pierwszym domniemanym receptorem komórki wątrobowej jest należący do rodziny tetraspazmin, receptor CD81. Innym receptorem jest powierzchniowa glikoproteina SR-BI (ang. *Human scavenger receptor class B type I*). Fizjologicznie wiąże ona lipoproteiny o dużej gęstości (HDL) i utlenione lub acylowane lipoproteiny o małej gęstości (LDL) i bierze udział w przezbłonowym dwukierunkowym transporcie. Następnym receptorem, który może potencjalnie brać udział w wejściu wirusa do komórki może być receptor LDL, który transportuje lipoproteiny na drodze endocytozy klatrynozależnej. Także białka z grupy kładyn, budujące połączenia ścisłe (ang. *tight junctions*) między hepatocytami oraz lektyny L-SIGN i DC-SIGN, mogą brać udział w tym procesie. Głównym białkiem wirusowym biorącym udział w wejściu wirusa do komórki jest białko otoczki E2<sup>20</sup>.

Po wnikięciu wirusa do komórki następuje uwolnienie jego RNA, a następnie synteza poliproteiny pierwotnej oraz jej przekształcenie w poszczególne białka. Białka te dojrzewają w połączeniu z błonami ER (**Rycina 2**). Translacja odbywa się w cytoplazmie, zaczyna się w wewnętrznym miejscu wejścia rybosomu (ang. *Internal ribosome entry site*, IRES), który znajduje się na końcu 5' NH<sub>2</sub> nici RNA w obszarze nie podlegającym translacji (ang. *untranslated region*, UTR), w mechanizmie niezależnym od czapeczki. Na matrycy dodatnio spolaryzowanej nici RNA wirusa następuje synteza pośredniej - interfazowej, ujemnie

spolaryzowanej nici RNA, służącej do syntezy dużej liczby nowych, dodatnio spolaryzowanych cząsteczek RNA (których jest 10 razy więcej niż nici interfazowych). Mogą być one użyte do translacji w poliproteinę pierwotną, służyć do syntezy kolejnych ujemnie spolaryzowanych nici pośrednich lub być upakowane w wiriony potomne, uwalniane z zakażonej komórki. Kluczową rolę w syntezie interfazowej i dodatnio spolaryzowanej potomnej nici RNA pełni polimeraza RNA-RdRp. W ostatnim etapie cyklu życiowego wirusa następuje uwolnienie potomnych wirionów z komórki. Formowanie cząstek wirusa jest inicjowane przez białko rdzenia HCV, które posiada zdolność tworzenia dimerów i polimerów tworzących nukleokapsyd, co ma miejsce prawdopodobnie w błonach ER, a ich transport odbywa się z udziałem aparatu Golgiego. Ostrożna ocena dynamiki replikacji HCV wskazuje, że połowiczny czas przeżycia wirusa wynosi od 3-5 godzin. Wątroba produkuje około  $10^{12}$ , a pojedyncza komórka wątrobowa około 50 cząstek wirusa na dobę<sup>11,12,13</sup>.



Rycina 2. Schemat cyklu życiowego HCV (na podstawie<sup>13</sup>, zmodyfikowany; opis w tekście).

## 5. Odpowiedź immunologiczna w zakażeniu HCV

Przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu C zależy od sprawnej odpowiedzi układu immunologicznego oraz wzajemnych interakcji gospodarz-wirus. W pierwszym okresie po zakażeniu, rozwija się odporność typu wrodzonego. Jest to starszy filogenetycznie układ od odporności nabytej, w którym główną rolę pełni sieć naturalnych przeciwciał, granulocyty, makrofagi, komórki NK, TNK oraz komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DCs). Duże znaczenie dla efektywnej obrony mają zdolne do rozpoznania wzorców antygenowych różnych drobnoustrojów (ang. *patogen-associated molecular patterns*), receptory bramkowe TLR (ang. *Toll-like receptors*), należące do systemu PRR (ang. *pattern recognition receptors*). Znanych jest 10 różnych TLR u człowieka. TLR-3, -4, -7, -8 i 9 są receptorami dla wzorców molekuł związanych z wirusami. Obecne są one na błonach komórkowych oraz wewnątrz pęcherzyków komórkowych niektórych limfocytów, makrofagów i DCs. Wyposażone są w nie komórki Browicza-Kupffera. Wiążą się z cząstkami drobnoustrojów, stymulują dojrzewanie DCs i wytwarzanie przez nie i inne komórki, cytokin prozapalnych. Biorą udział w wytwarzaniu substancji przeciw-drobnoustrojowych jak aktywne związki tlenu i azotu. Poprzez zdolność aktywacji limfocytów łączą odporność wrodzoną z układem odporności nabytej. HCV działa na różne TLR supresyjnie lub aktywizująco. Wykazano hamowanie ekspresji TLR 3 jako jedną z przyczyn przewlekłego zakażenia. Z drugiej strony wskazywano na aktywację prozapalnych cytokin, co powinno wspomóc hamowanie replikacji wirusa<sup>21,22</sup>. Komórki NK pełnią podstawową rolę we wrodzonym typie odpowiedzi immunologicznej. Mają zdolność do spontanicznej lizy komórek docelowych, zakażonych wirusem czy komórek nowotworowych. Nie podlegają restrykcji w zakresie antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I i zabijają komórki zakażone wirusem nie posiadające ich ekspresji. Regulacja działania komórek NK odbywa się za pomocą receptorów aktywujących i hamujących znajdujących się na ich powierzchni i oddziaływaniu z odpowiednimi ligandami na powierzchni komórek docelowych. Występują trzy główne nadrodziny receptorów: naturalny receptor cytotoksyczny NCRs (ang. *natural cytotoxicity receptor*) - aktywator cytolizy, immunoglobulinopodobne – KIR (ang. *killer Ig-like receptors*) aktywator i inhibitor cytolizy oraz receptory lektynowe typu C (ang. *killer lectine like receptors*), występujące w postaci heterodimerów aktywatory i inhibitory cytolizy. Oddziaływanie receptorów hamujących z antygenami MHC klasy I hamuje reakcję cytotoksyczną. Receptory aktywujące uruchamiają mechanizmy perforynozależne, prowadząc



do lizy komórek oraz wytwarzania cytokin, w tym IFN- $\gamma$ . Występują dwie subpopulacje komórek NK. Jedna o wysokiej ekspresji CD56 i niskiej CD16 wytwarzającej duże ilości IFN- $\gamma$  i małych właściwościach cytotoksycznych i druga - o niskiej ekspresji CD56 i wysokiej CD16, posiadającej silne właściwości cytotoksyczne i wytwarzającej małe ilości IFN- $\gamma$ <sup>23</sup>. HCV jest induktorem wytwarzania interferonu i stymuluje komórki NK. Jednak proporcje pomiędzy populacjami komórek NK w zakażeniu HCV i ich efektywna aktywacja są zaburzone. Uważa się, że jest to wynikiem wiązania białka otoczki E2 z cząsteczką CD81, występującą na komórkach NK, co blokuje sygnały dopływające do komórki<sup>24</sup>. Badania oparte o bardziej precyzyjne modele udowodniły jednak, że białko otoczki nie wpływa na funkcje komórek NK<sup>25</sup>.

Komórki TNK charakteryzują się posiadaniem zarówno receptorów komórek NK, jak i receptora limfocytów T. Aktywowane są przez receptor limfocytów T (ang. *T-cell receptor*, TCR) i przez interleukinę 12 (IL-12), produkowaną przez DCs i makrofagi wątrobowe. Aktywowane TNK wydzielają cytokiny typu Th1 (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) i Th2 (IL-4, IL-10, IL-13), co świadczy o ich dualizmie funkcjonalnym. TNK posiadają zdolności cytotoksyczne w mechanizmie typu Fas lub perforynowym<sup>26</sup>. W zakażeniu HCV wcześniej dochodzi do ich dysfunkcji, co wyraża się zmniejszeniem wytwarzania cytokin i ich mniejszą cytotoksycznością.

Komórki T $\gamma\delta$  występują w wątrobie u zakażonych HCV w znacznie zwiększonej ilości. Mają zdolność do wydzielania dużej ilości cytokin prozapalnych: TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  czy IL-8. Posiadają właściwości cytotoksyczne w mechanizmie niezależnym od MHC. Powodują lizę nie tylko komórek zakażonych wirusem, ale także i niezakażonych. Czynniki mogący wywoływać lizę komórek mogą być białka stresu hsp (ang. *heat shock proteins*). Jakkolwiek nie mają cech swoistości dla HCV, zwiększają swoją aktywność i wydzielanie cytokin pod wpływem białka otoczki E2, co jest wynikiem jej wiązania do cząstki CD81 znajdującej się na powierzchni komórek T $\gamma\delta$ . Komórki te niszczą zakażone jak i niezakażone hepatocyty, mogą także uszkadzać komórki wątrobowe w przebiegu zakażenia HCV<sup>27</sup>.

Komórkami łączącymi odpowiedź wrodzoną i nabytą są wspomniane już DCs. Posiadają one długie wypustki przypominając swoją budowę komórki nerwowe, mają właściwości żerne, a przede wszystkim są głównymi komórkami prezentującymi antygen (ang. *antigen presenting*

*cells*, APC). Stymulują liczne komórki biorące udział w odpowiedzi odpornościowej, zarówno bez uprzedniej stymulacji antygenem jak NK czy TNK oraz komórki wymagające takiej aktywacji, czyli swoście działające limfocyty T i B. Występują w dwóch podtypach, jako komórki mieloidalne mDCs wywodzące się z linii mieloidalnej i plasmacytoidalne pDCs z linii limfoidalnej. mDCs uczestniczą głównie w procesie rozpoznawania obcych antygenów, ich przetwarzania i prezentacji, powodują polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1. Natomiast pDCs odpowiedzialne za odpowiedź typu wrodzonego, szybko reagują na obecność wirusów produkując IFN typu I w ilościach większych 10 do 100 razy niż inne komórki odpowiedzi immunologicznej<sup>28</sup>. DCs aktywują limfocyty T CD4+ oraz w zależności od rodzaju czynnika infekcyjnego, wzbudzają odpowiedź Th1 lub Th2. Niedojrzałe DCs mogą wywoływać stan immunosupresji<sup>29</sup>. Dojrzewają pod wpływem cytokin i wzorców drobnoustrojów PAMP. Rozpoznanie obcego antygeny odbywa się poprzez receptory DCs. Szczególną rolę pełnią tu TLR. Po wychwyceniu antygeny rozpoczyna się przetworzenie sygnału i transkrypcja wielu genów. Komórki wędrują do węzła chłonnego, gdzie następuje uruchamianie mechanizmów odporności nabytej. W przypadku braku odpowiednich bodźców stymulujących mogą różnicować się w komórki nie posiadające pełnych cech dojrzałości, wchodząc wtedy w reakcje z limfocytami T zaburzają ich różnicowanie, prowadząc do ich anergii<sup>30</sup>.

W wątrobie DCs tworzą prawdopodobnie osobną subpopulację komórek i biorą udział w tworzeniu tolerancji immunologicznej typowej dla zdrowej wątroby. W zakażeniu HCV, poprzez fagocytozę ulegających apoptozie zakażonych hepatocytów, endocytozie kompleksów immunologicznych czy mikropinocytozie wirionów, wychwytyują antygeny wirusa. Po przetworzeniu antygenów i wytworzeniu swoistych peptydów w łączności z MHC klasy I lub MHC klasy II i kostymulującymi cząsteczkami na powierzchni komórki, stymulują różnicowanie i proliferację swoistych antygenowo limfocytów CD4+ i CD8+. W licznych badaniach wykazywano w zakażeniu HCV zaburzenie funkcji obu linii komórek dendrytycznych dotyczących ich dojrzewania, syntezy IFN, czy obniżonej zdolności aktywowania przez komórki NK. Zwracano uwagę na możliwości wiązania receptora CD81 z białkami wirusa jako przyczyny zaburzenia ich funkcji. W innych badaniach wykazywano brak różnic genotypowych i fenotypowych tych komórek u ludzi eliminujących wirusa i przewlekle zakażonych wirusem. Nie do końca wyjaśniony wpływ zakażenia HCV na DCs i ich rolę w tym

zakażeniu, pozwolił na wysunięcie hipotezy, iż mogą one wykazywać zaburzenia nie tyle związane z hamowaniem ich aktywności, ile mogą być nadmiernie aktywne w stymulowaniu cytotoksycznych limfocytów i w ten sposób brać udział w progresji uszkodzenia wątroby z rozwojem jej włóknienia<sup>31</sup>.

Niezmiernie ważnym elementem wrodzonej obrony przeciwwirusowej jest ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę IFN typu I ( $\alpha$  i  $\beta$ ). Pod jego wpływem w komórce dochodzi do aktywacji wielu, bo około 300 genów należących do grupy genów stymulowanych przez IFN (ang. *Interferon Stimulated Gene*, ISG). Interferon wywiera wielokierunkowe działanie przeciwwirusowe. Zwiększa ekspresję genów MHC na powierzchni APC i komórek docelowych, stymuluje DCs, NK oraz komórki odpowiedzi adaptywnej, limfocyty. Powoduje indukcję cząsteczek Fas i TRAIL, wpływając na apoptozę zakażonych komórek. Poprzez stymulację syntezy PKR hamuje syntezę białek wirusowych. Natomiast poprzez syntezę 2'-5'-oligoadenylołą (ang. *2'-5'-oligoadenylate synthetase*, 2'5'OAS), aktywuje wewnątrzkomórkową RNAzę, mogącą rozkładać RNA, czy poprzez białko ISG-56 hamować translację HCV. Synteza interferonu odbywa się pod wpływem podwójnoniciowego (ds) RNA wirusa, które jest rozpoznawane przez TLR-3 oraz w alternatywnej drodze przez białko sensorowe RIG-1 (ang. *retinoic acid inducible gene-1*). Po połączeniu z nimi następuje przekazanie sygnału do TRIF w przypadku receptora TLR-3 lub CARDIF w przypadku receptora RIG-1, a następnie do kompleksu kinaz TBK-1/Ikk-e (ang. *TANK binding kinase-1*), odpowiedzialnego za fosforylację IRF-3 i aktywację czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B. Aktywowany IRF-3 przemieszczany jest do jądra komórki, gdzie stymuluje transkrypcję genów odpowiedzialnych za produkcję endogenego Interferonu  $\beta$ . Ostatnim etapem jest produkcja interferonu i jego sekrecja do przestrzeni pozakomórkowej.

Interferon typu I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ) działa na specyficzne receptory błonowe INFAR-1/2 i związane z nim kinazy tyrozynowe: JAK-1 (ang. *Janus Family kinase-1*) i TYK-2 (ang. *tyrosine kinase-2*). Kinazy fosforylują białka STAT-1 i STAT-2 (ang. *signal transducers and activators of transcription*). Po przemieszczeniu do jądra komórki i połączeniu z białkiem p48 oraz IRF-9, formuje kompleks transkrypcyjny ISGF3 (ang. *Interferon stimulated gene factor 3*). Łączy się on z fragmentem genu w obszarze odpowiedzi stymulowanej przez Interferon - ISRE (ang. *Interferon stimulated response elements*) w regionie promotora dla wielu genów aktywowanych

przez Interferon. Skuteczność działania Interferonu jest bezspornie udowodniona, od 15 lat stanowi on wraz z analogiem nukleotydowym, Rybawiryną, podstawowy element leczenia zakażenia HCV. Sam wirus wytworzył wiele mechanizmów mogących wpłynąć na działanie Interferonu. Białko rdzenia odpowiedzialne jest za zakłócenie procesu fosforylacji STAT-1 i jego degradację, co hamuje przekazywanie sygnału do syntezy Interferonu<sup>32</sup>. Aktywuje ono także białko supresorowe dla produkcji cytokin SOCS-1 (ang. *suppressor of cytokine signaling-1*), które hamuje aktywację drogi Jak-STAT i obniża poziom receptorów dla Interferonu. Białko NS3-4A blokuje działanie czynnika IRF-3, który jest centralnym regulatorem syntezy IFN w reakcji na zakażenie wirusem, przez hamowanie jego fosforylacji i przemieszczenie do jądra komórki. Powoduje ono proteolityczną degradację TRIF i CARDIF<sup>33,34</sup>. Białko otoczki E2 oraz białko niestrukturalne NS5A blokują miejsce katalityczne PKR, osłabiając jej działanie. Ponadto białko NS5A zwiększa syntezę IL-8, która jest antagonistą interferonu i zmniejsza aktywność genów ISGs. Białka niestrukturalne HCV zmniejszają także efekt hamowania translacji wirusa przez ISG-56.

Nabyta odporność immunologiczna zależna jest od rozpoznania antygenów przez przeciwciała i receptory rozpoznające antygeny limfocytów T i B. Jednym z czynników utrudniających efektywną eliminację wirusa w mechanizmie swoistej odpowiedzi immunologicznej jest jego zmienność immunologiczna. Wynika ona z właściwości polimerazy RNA wirusa (kodowanej przez fragment NS5B RNA wirusa), która nie posiada zdolności do naprawiania błędów powstających w procesie szybkiej replikacji wirusa ( $10^9$  do  $10^{12}$  nowych genomów na dobę). Prowadzi to do powstawania różniących się wariantów wirusa tworzących pseudotypy (*quasispecies*). Drugim mechanizmem prowadzącym do powstawania pseudotypów jest ucieczka immunologiczna pod presją układu immunologicznego gospodarza, prowadząca do zmiany struktury epitopów wirusa. Najczęściej zmiany występują w rejonie hyperzmiennego HVR-1 genomu wirusa, odpowiedzialnej za syntezę białka otoczki E2, choć mogą występować też w innych miejscach genomu. Liczne mutanty są źródłem wariantów HCV o różnym stopniu przystosowania, od ginących niezdolnych do replikacji, do zdolnych do jej ciągłego podtrzymywania, tworzących warianty o dużym wigorze replikacyjnym. Wysokie tempo replikacji i częste zmiany budowy epitopów antygenowych wirusa prowadzą do nienadążania nabytej, swoistej odpowiedzi immunologicznej. Zestrojony dla danej determinanty antygenowej układ immunologiczny z komórkami prezentującymi antygen limfocytom w

kontekście kompleksu MHC, różni się od nowo powstających determinant antygenowych pseudotypów wirusa. Powoduje to konieczność ponownego dostosowywania się komórek swoistej odpowiedzi immunologicznej do nowej sytuacji antygenowej wirusa. Czynnikiem determinującym eliminację wirusa jest siła i efektywność odpowiedzi limfocytów CD4+ Th1<sup>35</sup>. Zwiększona liczba tej subpopulacji limfocytów, występuje u osób eliminujących wirusa. Słaba odpowiedź i zmniejszenie liczby oraz zaburzenia ich funkcji skojarzone są z przetrwaniem infekcji wirusowej. U osób kontrolujących wiramię, klirens wirusa może być bardzo szybki, lub po początkowym zmniejszeniu wirēmii (liczby kopii HCV-RNA), następuje jej wzrost, a następnie znów obniżenie, aż do eliminacji wirusa, lub do utrzymania replikacji na bardzo niskim poziomie. W około 40% przypadków nie dochodzi do indukcji swoistych limfocytów CD4+, co prowadzi do rozwoju przewlekłego zakażenia jako pierwotnej areaktywności, określanej jako *acute persistens*<sup>36,37</sup>. W przetrwałym zakażeniu HCV odpowiedź komórkowa jest osłabiona, limfocyty nie wykazują cech pełnego zróżnicowania. Limfocyty CD4+ wykazują cechy czynnościowej anergii ze zmniejszeniem wytwarzania IL-2. Prowadzi to nieadekwatnej odpowiedzi limfocytów CD8+ i zmniejszonego wytwarzania przez nie IFN- $\gamma$ . Limfocyty T CD8+ obecne w nacieku zapalnym wątroby mają mniejszą zdolność wytwarzania INF- $\gamma$ , co świadczy o niemożliwości pełnej lokalnej kontroli zakażenia. Posiadają natomiast zdolność do syntezy IL-10, co może sugerować posiadanie przez nie właściwości regulacyjnych i rozwoju tolerancji. Charakterystyczna dla HCV, ale i dla innych wirusów powodujących przechodzenie infekcji w stan przewlekły, jest trójfazowość reaktywności limfocytów CD8+. Najpierw bardzo silna ekspansja różnicujących się w komórki efektorowe i migrujących z narządów limfatycznych swoistych limfocytów. Kolejno - eliminacja w mechanizmie cytokinowym i perforynozależnym zakażonych komórek. Następnie w wyniku apoptozy, następuje obniżenie liczby limfocytów i w końcu tworzenie komórek pamięci z ciągłym podtrzymywaniem ich generacji. Zasadnicze znaczenie dla eliminacji wirusa ma różnicowanie się (kilka tygodni po zakażeniu) komórek pamięci o fenotypie CD8+CD127+ (receptor IL-7). Obecność tych komórek stwierdzana jest w przypadkach prowadzących do eradykacji wirusa. Komórkami niezbędnymi do powstawania komórek pamięci są limfocyty CD4+, zaś cytokiną odgrywającą podstawową rolę w regulacji ich proliferacji i długotrwałego rozwoju jest, produkowana przez komórki CD4+ w dużych ilościach, IL-2. Istotną właściwością limfocytów CD127+ jest zwiększona ekspresja antyapoptotycznej cząsteczki Bcl

2 w porównaniu z limfocytami CD8+ bez ekspresji CD127. Brak różnicowania w kierunku komórek z ekspresją CD127 jest wiązany z przetrwaniem zakażenia. Anergia cytotoksycznych limfocytów T CD8+, które to komórki są podstawowym elementem walki z HCV, wyraża się spadkiem ich proliferacji, obniżeniem wytwarzania cytokin i osłabieniem bezpośredniej cytotoksyczności<sup>35,38</sup>.

Istotną rolę w patogenezie zakażenia HCV pełnią limfocyty T regulatorowe (Treg). Podstawowym ich zadaniem jest hamowanie odpowiedzi immunologicznej na swoje i obce antygeny. Hamują proliferację, produkcję cytokin IFN- $\gamma$  i IL-2 oraz aktywność cytotoksycznych naiwnych i antygenowo specyficznych CD4+ i CD8+. Posiadają zdolność hamowania limfocytów B i APCs. Swoje supresyjne działanie mogą wywierać przez produkcję cytokin (TGF- $\beta$  i IL-10) oraz na drodze mechanizmów związanych z kontaktami komórka-komórka. Limfocyty regulatorowe mogą być naturalnymi komórkami powstającymi w grasicy, jak i powstawać w wyniku transformacji wysoko zróżnicowanych limfocytów T pamięci. Stwierdzono zwiększoną liczbę Treg we krwi obwodowej i w wątrobie z pzw C w porównaniu ze zdrowymi lub ozdowieńcami. Działanie immunosupresyjne Treg na limfocyty CD4+ i CD8+ może być jednym z czynników utrwalenia zakażenia, ale może też być czynnikiem hamującym ciężkość i rozległość uszkodzeń wątroby. Uważa się, że HCV nie jest wirusem cytotoksycznym, a uszkodzenie wątroby wywoływane jest raczej przez aktywność układu immunologicznego, a nie przez „zjadliwość” samego wirusa. Pacjenci z niskimi aktywnościami ALT i mniejszymi naciekami zapalnymi, częściej mieli większą produkcję TGF- $\beta$  przez Treg CD4+CD25+<sup>39</sup>.

Odpowiedź humoralna Th2 w wirusowym zapaleniu wątroby ma znacznie mniejsze znaczenie. Wczesna efektywna synteza przeciwciał, szczególnie skierowanych przeciwko N-końcowi hyperzmiennej sekwencji białka otoczki (HVR-1), może skutkować eliminacją wirusa a następnie obniżeniem i zanikiem przeciwciał przeciwwirusowych<sup>40</sup>, natomiast wytwarzanie przeciwciał o dużej różnorodności antygenowej i powstawanie licznych form *quasispecies* wirusa, skutkuje przetrwaniem zakażenia<sup>41</sup>. W zakażeniu HCV gospodarz wytwarza całe spektrum przeciwciał skierowanych przeciwko strukturalnym i niestrukturalnym białkom wirusa. Uważa się, że świadczą one raczej o wirerii, a nie o eliminacji wirusa. Przeciwciała skierowane przeciwko epitopom HVR-1 uważane są za przeciwciała neutralizujące.

Przeciwciała anti-HCV wykrywane są najczęściej w okresie od 7 do 8 tygodni od zakażenia. Ciągła zmienność antygenowa wirusa i tworzenie mutantów antygenowych umożliwia mu ucieczkę poza kontrolę układu immunologicznego, prowadząc do zjawiska dryfu genetycznego. W ciągu jednego miesiąca może dochodzić do 0,5-2 wymian aminokwasów w regionie HVR-1. Przeciwciała przeciwko białkom niestrukturalnym, jak helikaza czy polimeraza RNA korelują z procesem replikacji wirusa, natomiast przeciw antygenom rdzenia mogą być zarówno podczas trwania zakażenia, jak i po jego eliminacji. Ich obecność przy braku przeciwciał przeciw antygenom niestrukturalnym, może być uznawana za prognostyk eradykacji wirusa. Obecność przeciwciał klasy IgM nie jest ograniczona do ostrego okresu zakażenia, lecz są one obecne także w przewlekłym zakażeniu towarzysząc zmianom antygenowym wirusa. Należy nadmienić, że wykrycie przeciwciał anti-HCV bez potwierdzenia obecności RNA nie może być podstawą do rozpoznania zakażenia, tak samo jak brak przeciwciał w surowicy nie może wykluczyć zakażenia, ponieważ w pojedynczych przypadkach możliwe jest zakażenie HCV z opóźnioną serokonwersją lub nawet bez niej<sup>42</sup>. W odpowiedzi immunologicznej na zakażenie HCV ważny jest fakt, że ujemną interfazową nić RNA wirusa znajdowano w progenitorowych komórkach hematopoetycznych CD34+, we wczesnych fazach ich zróżnicowania. Mogą one być istotnym źródłem rozprzestrzeniania się wirusa i wzbudzania tolerancji na wirusowe antygeny podczas dojrzewania zakażonych komórek w grasicy i ich limfoproliferacji<sup>43</sup>. Wyniki badań porównawczych u osób przewlekle zakażonych i osób eliminujących wirusa wskazują, że podstawowym czynnikiem ograniczającym a następnie prowadzącym do eradykacji wirusa jest harmonijna, silna odpowiedź układu immunologicznego, obejmująca zarówno wrodzone jak i nabyte mechanizmy odporności. U ozdowieńców utrzymuje się mocna swoista odpowiedź limfocytów CD4+ i CD8+ na antygeny wirusa.

#### 6. Zmiany morfologiczne w wątrobie w zakażeniu HCV

Zmiany histopatologiczne w zapaleniu wątroby typu C, zarówno o przebiegu ostrym, jak i przewlekłym charakteryzują się występowaniem zmian degeneracyjnych hepatocytów oraz obecnością różnej wielkości nacieków zapalnych. Komórkami nacieków zapalnych podobnie jak w zapaleniach wątroby o innej etiologii, są głównie limfocyty, komórki plazmatyczne oraz komórki prezentujące antygen, obecne w przestrzeniach bramnożółciowych i wewnątrzrazikowo. Zmiany degeneracyjne hepatocytów występują pod postacią obrzmienia

komórek, kwasochłonnych zmian wstecznych z tworzeniem ciałek kwasochłonnych. Martwica hepatocytów może mieć charakter ogniskowy i dotyczyć pojedynczych komórek czy tzw. zlewna, kiedy obejmuje większy obszar sąsiadujących hepatocytów. Widoczna jest pod postacią pól pozbawionych miąższu narządu, zawiera elementy tkanki łącznej, komórki nacieków zapalnych z dużą liczbą makrofagów. Jeśli martwica zlewna łączy struktury naczyniowe, nazywana jest martwicą mostkową. Na granicy zrazika wątrobowego i przestrzeni wrotnej występuje tzw. martwica kęsowa (ang. *piecemeal necrosis*), którą uważano kiedyś za szczególnie przydatne kryterium aktywności zapalnej. Dzisiaj ma ona znaczenie podobne jak pozostałe formy martwicy wątroby<sup>44</sup>.

Obraz histologiczny wątroby w zakażeniu HCV przypomina zmiany obserwowane w zakażeniu wirusem zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*, HBV). Istnieją jednak pewne specyficzne, choć niecharakterystyczne cechy zakażenia HCV, pozwalające odróżnić efekty działania obu wirusów. HCV częściej powoduje uszkodzenie nabłonka dróg żółciowych, tworzą się uformowane grudki chłonne w przestrzeniach bramnożółciowych, często stwierdza się ogniskowe wielkowodniczkowe stłuszczenie hepatocytów oraz obecność ciałek Mallory`ego<sup>41,45</sup>. Rzadziej spotyka się tzw. transformację olbrzymiokomórkową hepatocytów, zmiany dysplastyczne tych komórek czy aktywację komórek zapalenia w sinusoidach<sup>44</sup>.

Szczegółowe badania morfologiczne wątroby z przewlekłym zakażeniem HCV wykazały przede wszystkim zmiany w strukturze jąder hepatocytów. Polegały one na zmianie ich kształtu, hiperchromazji, zaburzeniu struktury chromatyny, zwiększeniu liczby jąderek oraz uszkodzeniu błony jądrowej. Na poziomie ultrastrukturalnym obserwowano lobulizację jąder komórkowych i obecność licznych wtętów. Chromatyna jądrowa ulegała kondensacji i marginalizacji, tworząc kompleksy tubul lub rozgałęzionych włókien o średnicy 20-30 nm, którym towarzyszyły podobne struktury w szorstkiej ER. Wykazano także uszkodzenie mitochondriów, z utratą ich dwuwarstwowej struktury. W cytoplazmie opisano zwiększenie liczby liposomów, ilości błon ER, obecność wirusopodobnych cząstek lub ich agregatów oraz osmofilnych wolnych tubul. Potwierdzono obecność licznych wakuoli lipidowych, przemieszczających jądro i struktury cytoplazmatyczne na obwód komórki<sup>46</sup>.

Ocenę nasilenia aktywności zapalnej (ang. *grading*) oraz zaawansowania włóknienia wątroby (ang. *staging*) podaje się w oparciu o skale punktowe. Skale oceniające aktywność zapalną w



przewlekłym zapaleniu wątroby ulegają ciągłej ewolucji, od pierwszej wg Knodell i wsp.<sup>47</sup> do aktualnie uproszczonych: Batts-Ludwiga, Gabryela i Zielińskiego, Scheuera, Stolarczyka, Ishaka czy skali METAVIR<sup>48</sup>. W skali według Scheuera ocenianej od 0 do 4 pkt, z możliwością stosowania stanów przejściowych np. 2/3, w ocenie powyżej 3 zawsze istnieje inwazja blaszek granicznych. W skali tej bierze się pod uwagę dwie kategorie zmian zapalnych, tj. martwicę kęsovą (i intensywność nacieku w przestrzeniach wrotnych) oraz aktywność zapalną wewnątrz zrazików (i ewentualnie martwicę przęsłową)<sup>49,50,51</sup>.

## 7. Molekularne aspekty włóknienia wątroby w zakażeniu HCV

Wieloletni proces zapalny w wątrobie na tle zakażenia HCV może doprowadzić do rozwoju włóknienia i marskości wątroby z nadciśnieniem wrotnym i ryzykiem krwawienia z przewodu pokarmowego, wodobrzuszem, encefalopatią, zaburzeniem syntezy i funkcji metabolicznych hepatocytów. Głównymi komórkami odpowiedzialnymi za rozwój włóknienia wątroby są komórki gwiaździste (ang. *hepatic stellate cells*, HSCs), nazywane także komórkami perisinusoidalnymi, parasinusoidalnymi, lipocytami, komórkami magazynującymi tłuszcz czy komórkami Ito. Stanowią około 15% całkowitej liczby komórek wątroby i zlokalizowane są w przestrzeniach Dissego. W cytoplazmie HSCs zawierają witaminę A i są jej głównym magazynem. W odpowiedzi na czynnik uszkodzający ulegają aktywacji, przemieniając się w komórki zbliżone do miofibroblastów i rozpoczynają syntezę kolagenu (głównie I typu)<sup>52,53,54</sup>. Aktywacja HSCs następuje w dwóch fazach: inicjacji oraz rozwinięcia i podtrzymania aktywacji. Faza inicjacji obejmująca wczesne zmiany ekspresji genów i fenotypu wywoływana jest przez stymulację parakrynną, płynącą z prawie wszystkich typów komórek znajdujących się w otoczeniu oraz zmian zachodzących w macierzy pozakomórkowej pod wpływem bodźców uszkodzających. Hepatocyty są źródłem wolnych rodników z uszkodzonych błon komórkowych i peroksydacji lipidów, a ich apoptoza aktywuje HSCs i komórki Browicza-Kupffera. Te ostatnie wydzielają cytokiny, głównie TGF- $\beta$  i wolne rodniki tlenowe. Komórki *endothelium* aktywują HSCs przez konwersję latentnego TGF- $\beta$  do formy aktywnej oraz poprzez syntezę komórkowej izoformy fibronektyny. Płytki krwi wydzielają płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF), naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*, EGF) oraz TGF- $\beta$ 1, potęgując aktywację HSCs<sup>53,54</sup>. Faza rozwinięcia

i podtrzymania aktywacji jest wynikiem utrzymującej się ciągłej stymulacji parakrynej, ale także autokrynej. Dochodzi w niej do utraty retinoidów przez HSCs, ich namnażania, migracji, fibrynogenezy, wzrostu kurczliwości oraz degradacji macierzy. Skutkuje to nagromadzeniem macierzy pozakomórkowej i zmiana jej struktury na typową dla gojących się blizn. Wczesnym objawem aktywacji HSCs jest także utrata okołojądrowych kropelek witaminy A. Pod wpływem czynników chemotaktycznych HSCs przemieszczają się do ognisk uszkodzenia wątroby. Oprócz aktywacji HSCs, podstawą włóknienia jest także proliferacja tych komórek. Najsilniej stymulowana jest ona przez PDGF, VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), EGF, TGF- $\alpha$ , czynnik wzrostu fibroblastów  $\beta$  (ang. *fibroblast growth factor  $\beta$* , FGF- $\beta$ ) i keratynocytów (ang. *keratinocyte growth factor*, KGF). Drugim elementem w procesie włóknienia jest wytwarzanie komponentów macierzy – kolagenu typu I, proteoglikanów, fibronektyny komórkowej przez HSCs, co stymulowane jest przez produkty peroksydacji lipidów, a zwłaszcza przez TGF- $\beta$ <sup>53,54</sup>.

Z czynników wzrostu, podstawową rolę we włóknieniu wątroby odgrywa TGF- $\beta$ . Pobudza do proliferacji HSCs, zmienia je w miofibroblasty, zwiększa syntezę i sekrecję macierzy pozakomórkowej, hamuje także jej degradację. TGF- $\beta$  uwalniany jest przez komórki Browicza-Kupffera, *endothelium* naczyń, a także same HSCs. Powoduje mobilizację komórek zapalnych w miejscu uszkodzenia wątroby. Kurczliwość komórek gwiaździstych obecnych w przegrodach łącznotkankowych oraz zmniejszanie objętości marskiej wątroby warunkują wzrost oporów przepływającej krwi i rozwój nadciśnienia wrotnego. Kurczliwość HSCs pozostaje głównie pod kontrolą endoteliny-1 i tlenu azotu, ale wpływają na nią także inne mediatory, jak: angiotensyna II, eikozanoidy, natriuretyczny peptyd przedsionkowy, somatostatyna czy tlenek węgla. W aktywnych HSCs wzrasta synteza kurczliwych filamentów. Zaburzenia równowagi pomiędzy syntezą i degradacją macierzy pozakomórkowej oraz synteza nieprawidłowej macierzy, prowadzą do kumulacji macierzy bliznowatej. Wywiera ona niekorzystny wpływ na czynność komórek wątroby i stanowi podstawę do inwazji nowotworowej i desmoplazji<sup>53,54</sup>.

Główną rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej pełnią zależne od wapnia metaloproteinazy, matriksyny, rozkładające kolagen i niekolagenowe składniki macierzy. HSCs są głównym źródłem metaloproteinaz MMP-13 należącej do kolagenaz mięsoszowych, MMP-2 i MMP-9 należącej do grupy żelatynaz. Aktywność metaloproteinaz regulowana jest przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*, TIMP). W

HSCs syntetyzowana jest TIMP-1 i TIMP-2, co przy ich zwiększonej proliferacji może prowadzić do obniżenia degradacji macierzy, a tym samym do jej kumulacji. TIMP-1 hamując apoptozę komórek gwiazdzistych zwiększa ich aktywną pulę. W przypadku ustąpienia czynników uszkodzających dochodzi do obniżenia liczby HSCs w wyniku apoptozy lub ich powrót do fenotypu spoczynkowego. Induktorami apoptozy są ligandy FasLICD95L, TRAIL (ang. *TNF related apoptosis inducig ligand*) i czynnik wzrostu nerwów (ang. *Nerve Growth Factor, NGF*). Komórki NK pobudzają apoptozę HSCs w mechanizmie zależnym od TRAIL a mniejsza ich aktywność w starszym wieku może tłumaczyć nasilenie włóknienia u starszych ludzi oraz u poddanych skojarzonemu leczeniu immunosupresyjnemu cyklosporyną ze sterydoterapią. Oprócz HSCs we włóknieniu wątroby biorą także udział fibroblasty układu wrotnego, komórki mięśni gładkich zlokalizowane w ścianie naczyń, miofibroblasty znajdujące się w okolicy żyły centralnej<sup>53</sup>. W aktywacji i transformacji komórek gwiazdzistych uczestniczy również szlak Wnt (opisany w dalszej części Wstępu).

#### 8. Rola białek HCV w wątrobowej onkogenezie

Patomechanizm zakażenia HCV w rozwoju pierwotnego raka wątroby (HCC) nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. HCV jest wirusem RNA i jego genom nie ulega wbudowaniu do DNA komórek gospodarza. Przewlekły proces zapalny wywołany wirusami hepatotropowymi jak HBV i HCV wraz z towarzyszącym im włóknieniem wątroby, jest najczęstszą przyczyną rozwoju pierwotnego raka wątroby. Jedynie w 29% HCC nie stwierdzono w badaniach serologicznych i molekularnych obecności wirusów HCV lub HBV, a antygen powierzchniowy HBV oraz przeciwciała anti-HCV stwierdzane były odpowiednio w 19% i 40% pacjentów z rozpoznaniem HCC<sup>55</sup>. Dodatkowymi czynnikami sprzyjającymi karcynogenezie są niektóre leki, narkotyki, alkohol, aflatoksyny, sterydy anaboliczne czy toksyny sinicowe (mikrocystyny). Onkogenezie sprzyjają choroby metaboliczne jak hemochromatoza dziedziczna, niedobór alfa-1 antytrypsyny, stłuszczenie, niealkoholowe stłuszczenie wątroby czy cukrzyca. Przemiana złośliwa hepatocytów związana jest z przyspieszoną odnową komórek, indukowaną ich przewlekłym uszkodzeniem i regeneracją, a wywołana przewlekłym stanem zapalnym i oksydacyjnym uszkodzeniem DNA. Takie środowisko ułatwiające pojawienie się genetycznych i epigenetycznych zaburzeń występuje w regeneracyjnych

guzkach marskiej wątroby. 70-90% HCC rozwija się bowiem w marskiej wątrobie, a tylko 10% obserwowane było w wątrobie bez cech marskości. Dysplastyczne regeneracyjne guzki można nazwać stanem przednowotworowym<sup>56</sup>. Karcynogeneza wątrobowa jest wieloetapowym, wieloletnim procesem prowadzącym do akumulacji zaburzeń genetycznych i epigenetycznych i ostatecznie do przemiany złośliwej. Co najmniej cztery ścieżki sygnałowe, regulujące proliferację lub śmierć komórki mogą być związane z nowotworzeniem w wątrobie. Są to drogi z wykorzystaniem białka p53, pRb-fosforetinoblastomy, TGF- $\beta$  oraz  $\beta$ -kateniny<sup>57,58</sup>. Jakkolwiek rozwój HCC związany jest z nasileniem regeneracji i proliferacji komórek oraz rozwojem marskości, wydaje się, że białka wirusa HCV a szczególnie białko rdzenia (białko C, kapsydowe), białko otoczki E2, niestrukturalne białka NS3, NS4B i NS5A są w sposób bezpośredni powiązane z transformacją nowotworową<sup>59</sup>. Białko C wpływa na aktywność transkrypcyjną, sygnalizację komórkową, apoptozę i metabolizm lipidów. Łączy się z wieloma białkami hepatocytów, m.in. z białkami hamującymi rozwój nowotworów, kontrolującymi cykl komórkowy: p53<sup>60,61</sup>, p73<sup>62</sup>, pRb<sup>63</sup>, z białkiem p21/Waf 1 - efektem p53, regulującym aktywność kompleksu cykliny i cyklino-zależnej kinazy (ang. *cyclin/CDK complex*). Niedojrzała postać białka C wirusa zawierająca 1-191 aa zwiększa ilość p21/Waf1 przez aktywację p53, natomiast forma dojrzała zmniejsza ilość tego białka w mechanizmie niezależnym od p53<sup>64</sup>. Białko rdzeniowe HCV wpływa na ekspresję genów przez interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi jak LZIP, należącym do rodziny bZip (ang. *Basic Leucine Zipper Domain bZIP domain*), zawierających tzw. zamek leucynowy, który pozwala wiązać się z nicią DNA. Utrata funkcji endogennego LZIP koreluje z nieprawidłową proliferacją komórkową<sup>65</sup>. Białko C wiąże się z heterogenną jądrową rybonukleoproteiną K (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*, hnRNP), białkiem biorącym udział w przemianach i transporcie premRNA a także związanym z regulacją cyku komórkowego (zatrzymanie podziału komórki w mechanizmie zależnym od białka p53)<sup>66,67</sup>. Wpływa na translację RNA przez reakcję z helikazą *DEAD box protein* (DBX3)<sup>68</sup>. Białko C może wpływać na cykl komórkowy, różnicowanie i apoptozę komórek także poprzez łączenie z izoformą epsilon białka 14-3-3<sup>69</sup>. Wpływ białka C HCV na apoptozę co może być również wynikiem jego interakcji z LT $\beta$ R (ang. *Lymphotoxin  $\beta$  Receptor*) czy z receptorem TNF (TNFR1), którego cytoplazmatyczna część zawiera tzw. domenę śmierci (ang. *cell death domain*)<sup>70</sup>. Ucieczka z mechanizmu apoptozy przy udziale białka rdzeniowego HCV może także odbywać się przez hamowanie

Fas-zależnej śmierci komórki, na drodze blokowania uwalniania z mitochondrów cytochromu c i hamowania aktywności kaspaz 9 i 3/7<sup>71</sup>. Białko rdzenia może wywierać także wpływ immunosupresyjny, przez reakcję z receptorem komplementu C1qR limfocytów T, co skutkuje przewlekaniem się zakażenia<sup>72</sup>.

Białko rdzeniowe HCV wydaje się wywierać działanie pośrednie na regulację transkrypcji genów przez integrację z cytoplazmatycznymi molekułami licznych szlaków sygnałowych. I tak, opisano aktywację kinaz aktywowanych mitogenami MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) – INK (ang. *C-Jun N terminal kinases*) i ERK (ang. *extracellular-signal regulated kinase*), aktywację izoformy p38, szlaku Raf/MAPK, promując proliferację komórkową<sup>73,74</sup>. Obserwowano wpływ białka C na czynnik transkrypcyjny NFκB, który bierze udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej na infekcję, a zaburzenia w jego regulacji powiązane są z chorobami nowotworowymi, autoimmunologicznymi, niewłaściwym rozwojem układu immunologicznego, przy czym w niektórych badaniach stwierdzono jego aktywację<sup>75</sup>, a w innych hamowanie aktywności<sup>76</sup>.

Co ciekawe dla założeń obecnej pracy, obserwowano także aktywację szlaku Wnt/β-katenina przez białko C HCV, z indukcją proliferacji komórkowej, syntezy DNA, progresji cyklu komórkowego z aktywacją transkrypcyjną genów. Większość z nich powiązana jest z regulacją wzrostu komórek, metabolizmu lipidów, ze zmniejszeniem aktywności genów związanych z odpowiedzią zapalną i odpornością immunologiczną. Stwierdzono zwiększoną aktywność Wnt-1 oraz aktywowanego przez niego genu WISP-2 (ang. *Wnt-1-inducible-signaling pathway protein 2*)<sup>77</sup>.

U większości pacjentów z zakażeniem HCV występuje także podwyższone stężenie TGF-β, co koreluje ze stopniem zwłóknienia wątroby, a jego wpływ na HSCs i macierz pozakomórkową wskazuje na rzeczywistą aktywację TGF-β u zakażonych HCV<sup>78</sup>. Wykazano, że aktywność szlaku TGF-β również jest związana z działaniem białka C, które poprzez interakcję z białkiem Smad-3 (przekaznik w szlaku TGF-β), hamuje aktywność tej ścieżki sygnałowej. Wykazano przy tym, iż tylko białko rdzenia izolowane z komórek guza wywoływało takie zjawisko. Może to sugerować, że w przebiegu wieloletniego zakażenia dochodzi, w wyniku dużej zmienności genetycznej, do selekcji klonów wirusa potrafiących blokować szlak o działaniu hamującym rozwój nowotworów. TGF-β wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 prawdopodobnie przez zwiększenie aktywności inhibitorów CDK, takich jak m.in. p21, p27,

p15 oraz stymuluje apoptozę. Białko rdzenia HCV wiążąc się z błonami komórkowymi, kroplami lipidów, apolipoproteiną II, zmniejszając aktywność mikrosomalnych białek transportujących trójglicerydy - MTP, prowadzi do zaburzeń w gromadzeniu i wydzielaniu lipoprotein o bardzo małej gęstości oraz rozwoju stłuszczenia<sup>79</sup>.

Wpływ białka otoczki E2 na onkogenezę jest mniej bezpośredni. Przez hamowanie aktywności kinazy zależnej od RNA, moduluje efektywność działania interferonu<sup>80</sup>. Jego rozpuszczalna forma łączy się z występującą na powierzchni komórek cząsteczką CD81 zmniejszając aktywację limfocytów, DCs czy NK. Podobnie jak z białkiem CD81<sup>24,81</sup>, łączy się z receptorem LDL na powierzchni komórek, aktywując ścieżkę sygnałową MAPK/ERK, co prowadzi do obniżenia aktywności czynnika transkrypcyjnego ATF-2 (ang. *Activating transcription factor 2*) i promocji proliferacji komórek oraz ich przeżycia<sup>82</sup>.

Białko NS3 może doprowadzić samodzielnie do transformacji komórek ssaków, jakkolwiek dokładny mechanizm i powiązanie tego białka z rozwojem HCC nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Połączenie z C końcem białka p53 powoduje zmniejszenie transkrypcji p21/Waf1, który jest głównym czynnikiem regulującym białka p53<sup>83</sup>. NS3 zawiera miejsce wiążące histony, podlegające modyfikacjom potranslacyjnym niezbędnym do replikacji DNA lub transkrypcji, wiąże się z histonami H2A i H4<sup>84</sup>. Hamuje aktywność kinazy białkowej A (PKA), jej translokację do jądra i katalizowanie fosforylacji białek w odpowiedzi na stymulację. Ponadto hamuje aktywność kinazy białkowej C (PKC), ponieważ może być przez nią fosforylowane, a więc jako substrat stanowi konkurencję kompetycyjną z normalnymi jej substratami<sup>84</sup>. Hamuje także syntezę Interferonu typu I mediowaną przez IRF 3(ang. *interferon regulatory factor 3*), co może wpływać na przetrwanie infekcji wirusowej<sup>85</sup>.

Białko NS5A wpływa na wiele różnorodnych i ważnych funkcji komórki takich jak: apoptoza, ścieżki sygnałowe, aktywność transkrypcyjna czy transformacja komórkowa. Jest inhibitorem kinazy białkowej R (PKR), będącej jednym z czynników obrony przeciwwirusowej aktywowanej przez dsRNA biorącej udział w aktywacji IRF 1<sup>86</sup>. Indukowana przez NS5A synteza IL-8 prowadzi do hamowania przeciwwirusowego efektu działania interferonu<sup>87</sup>. NS5A łączy się z receptorem SNAP, który jest przezbłonowym białkiem odpowiedzialnym za fuzję między pęcherzykami i błonami komórkowymi, biorącym udział m.in. w regulacji egzocytozy czy transportu komórkowego i pośredniczy w połączeniach ze strukturami błonowymi<sup>88</sup>. NS5A łączy się także kroplami lipidowymi i lipoproteiną I, co może wskazywać na jej związek ze

stłuszczeniem komórki<sup>89</sup>. Interakcja z białkiem *karyopherin*  $\beta$ -3 biorącym udział w transporcie pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym, może sugerować udział białka NS5A w tym procesie<sup>90</sup>. Łączy się z niereceptorową białkową kinazą tyrozynową SYK i zmniejsza jej aktywność. SYK jest związana rozwojem i dojrzewaniem limfocytów B, komórek tucznych, agregacją płytek krwi, ale także jest białkiem supresorowym guzów w raku sutka. Zmniejszona jego aktywność może wpływać na rozwój HCC<sup>91</sup>. Białko NS5A oprócz wpływu modyfikującego na ścieżki sygnałowe komórki, wywiera także wpływ na proces transkrypcji genów. Połączenie końca NH<sub>2</sub> białka NS5A z domeną wiążącą DNA (ang. *DNA binding domain*, DBD) i pochodzącego od drożdży czynnika transkrypcyjnego Gal4, nasilało aktywność transkrypcyjną<sup>92</sup>. NS5A w swojej niezmienionej postaci występuje w połączeniach ze strukturami błonowymi w cytoplazmie komórki. Jednak w wyniku działania kaspaz dochodzi do cięcia tego białka na mniejsze fragmenty, których obecność można stwierdzić w jądrze komórkowym, a fragment N-końcowy połączony z Gal4, w obecności PKA wykazuje aktywność transkrypcyjną<sup>93</sup>. Pocięte fragmenty NS5A posiadają także właściwości modulujące transkrypcję, mają zdolność tworzenia kompleksów z białkiem wiążącym TATA Box (ang. *TATA Box binding protein*, TBP) oraz białkiem p53. Białko NS5A hamuje połączenie się zarówno p53, jak i TBP z odpowiednim miejscem wiązania w obrębie DNA oraz tworzenie kompleksów p53 z TBP. Hamuje aktywność transkrypcyjną p53, zmniejsza aktywność regulowanego przez p53, białka p21/WAF1. Aktywność transkrypcyjna p53 pod wpływem NS5A zmniejsza się 3-5 razy. Zaburza także tworzenie kompleksów p53 z białkiem ERCC3 (ang. *excision repair cross complementing factor 3*), które przez syntezę białka TFIIH (ang. *transcription factor IIIH*) bierze udział w regulacji transkrypcji i naprawy uszkodzonego DNA<sup>94</sup>. NS5A wiąże się także z biorącym udział w regulacji transkrypcji, białkiem hTAF(II)32 (ang. *human TATA binding protein associated factor*), komponentem TFIID - podstawowym koaktywatorem p53 i uniemożliwia jego działanie. Istotnym może także być fakt podobnej okołojądrowej kolokalizacji białek p53, NS5A i hTAF(II)32. W rezultacie interakcji pomiędzy NS5 i białkiem p53 oraz elementami biorącymi udział w regulacji jego działania, dochodzi do hamowania zależnej od niego apoptozy, co może być kluczowym elementem karcynogenezy<sup>95</sup>. NS5A moduluje wiele szlaków sygnałowych regulujących wzrost komórki i jej różnicowanie, poprzez łączenie z adaptorowym białkiem wiążącym receptor czynnika wzrostu G2b2, który bierze udział w regulacji wielu ścieżek sygnałowych. Stanowi połączenie pomiędzy receptorem

czynnika wzrostu na powierzchni komórki, a ścieżką sygnałową Ras, którą hamuje. NS5A posiada odcinek bogaty w sekwencje zawierające PRO, którym łączy się z grupami SH2 i SH3 białka G2b2<sup>96</sup>. NS5A wpływa na hamowanie wzrostu i zaburzenie cyklu komórkowego przez wpływ na zależną od cykliny kinazę CDK1/2, skraca fazę S a wydłuża fazę G2/M cyklu komórkowego<sup>97</sup>. Białko to łączy się i aktywuje także kinazę 3 fosfoinozytolu (PI3K), przez połączenie z domeną SH3 podjednostki regulatorowej p58, a następnie aktywację podjednostki katalitycznej p110, co skutkuje aktywacją AKT/PKB i hamowaniem aktywacji GSK3 (ang. *Glycogen synthase kinase 3*), prowadząc do hamowania apoptozy i kumulacji cytoplazmatycznej  $\beta$ -kateniny, aktywacji czynników transkrypcyjnych LEF i TCF oraz aktywacji wielu genów biorących udział w onkogenezie<sup>98</sup>. Stabilizacja i kumulacja  $\beta$ -kateniny z jej następstwami transkrypcyjnymi odbywa się także w drodze niezależnej od GSK3 i AKT, ale w wyniku innych efektorów PI3K (ang. *Phosphatidylinositide 3-kinase*)<sup>99</sup>. Onkogeneza wywoływana przez HCV może wynikać także z indukowania przez wirus stresu *reticulum* endoplazmatycznego, mechanizmu homeostazy w odpowiedzi na zaburzenia biosyntezy białek. Łagodny stres ER wpływa na syntezę białek, hamowanie wzrostu komórki, podczas gdy silny lub długotrwały stres wywołuje apoptozę przez aktywację związanej z ER, kaspazy 12. Długotrwały stres związany z zakażeniem HCV może prowadzić do kumulowania zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych czynników uszkodzających DNA i mutagenezy. U pacjentów HCV-dodatnich stwierdza się znacznie podwyższone markery stresu oksydacyjnego. Przejściowa ekspresja NS5A powoduje zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, indukuje stres oksydacyjny, aktywuje szlaki sygnałowe, takie jak m.in. MAPK, STAT-3 i NF $\kappa$ B<sup>100</sup>.



## 9. Szlak sygnałowy Wnt/Frizzled/ $\beta$ -katenina

Szlak sygnałowy Wnt bierze udział w regulacji wielu, warunkujących prawidłowy rozwój organizmu procesów, zarówno u bezkręgowców jak i u kręgowców. Jego prawidłowa aktywność jest niezbędna w procesach embriogenezy, proliferacji, migracji i przylegania komórek, a także regulacji aktywności komórek macierzystych. Zaburzenia genetyczne lub czynniki zewnętrzne (wirusy, toksyny) powodujące jego dysfunkcje są przyczyną wielu chorób. Należą do nich m.in. różne typy nowotworów, zaburzenia neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera), neuropsychiatryczne (schizofrenia) i metaboliczne<sup>101,102,103,104</sup>.

Pierwszy ligand z rodziny Wnt u ssaków został zidentyfikowany w obrębie genu nazwanego int-1 (w *adenocarcinoma* sutka), ponieważ ulegał aktywacji poprzez integrację fragmentu LTR mysiego wirusa raka sutka (ang. *mouse mammary tumor virus*, MMTV)<sup>104</sup>. Wkrótce zademonstrowano jego właściwości onkogenne<sup>105</sup>. Drugi człon nazwy Wnt pochodzi od nazwy homologicznego genu u *Drosophila* odpowiedzialnego za brak skrzydełek (ang. *wingless*) u muszki owocówki<sup>106</sup>. Związanie liganda Wnt z receptorem prowadzi do aktywacji ścieżki kanonicznej (klasycznej) zależnej od  $\beta$ -kateniny lub jednej z dwóch ścieżek niekanonicznych. Ścieżki niekanoniczne działają niezależnie od  $\beta$ -kateniny. Należy do nich ścieżka polarna - kontrolująca rearanżację cytoszkieletu oraz migrację neuronów poprzez wpływ na białko RhoA i kinazę Jun oraz ścieżka zależna od jonów wapnia, działająca poprzez kinazę zależną od kalmoduliny - kalcineurynę i czynnik transkrypcyjny NF-AT (ang. *nuclear factor of activated T cells*)<sup>107</sup>.

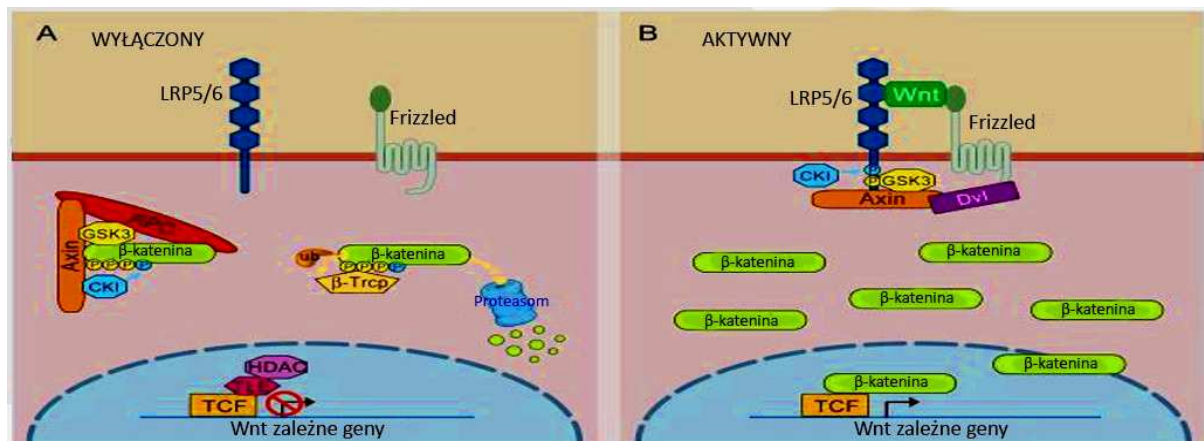
Aktywacja konkretnej ścieżki zależy od rodzaju liganda, receptora oraz warunków panujących w komórce. W obecnej pracy uwagę poświęcono głównie ścieżce kanonicznej.

### 9.1. Kanoniczna ścieżka Wnt/Fzd/ $\beta$ -katenina

Kluczową rolę w kanonicznej ścieżce Wnt pełni białko  $\beta$ -katenina, kodowane przez gen CTNNB1 zlokalizowany na chromosomie 3p21-p22, obejmujący region zbudowany z 23 kb DNA i 16 egzonów (pierwszy jest niekodujący). Po transkrypcji powstaje mRNA złożony z 3362 nukleotydów, z czego 2343 bp tworzy region ORF<sup>108</sup>. cDNA dla  $\beta$ -kateniny zostało sklonowane po raz pierwszy z biblioteki *Xenopus*<sup>109</sup>. 15 kodujących egzonów tworzy wysoko konserwatywne białko zbudowane z 781 aa, zaliczane wraz z plakoglobina i ich homologiem u *Drosophila*, do rodziny białek *armadillo*<sup>110</sup>.  $\beta$ -katenina składa się z N-końca zawierającego 149

aa i z domeny centralnej zbudowanej z 515aa, posiadającej dwanaście tzw. ramion powtórzeń aminokwasowych homologicznych z białkami *armadillo* u *Drosophila*. Strukturalnie są one zbudowane z trzech spirali alfa tworzących razem superspiralę i biorą udział w konkurencyjnym łączeniu wielu białek - do cytoplazmatycznej domeny E-kadheryny, białka APC (ang. *Adenomatous polyposis coli*), aksyny (ang. *Axin*) i kompleksu transkrypcyjnego LEF (ang. *lymphoid enhancer factor*)/TCF (ang. *T cell factor*). Domenę C-kończową  $\beta$ -kateniny buduje 108 aa<sup>111</sup>.  $\beta$ -katenina degradowana jest przy udziale aksyny, tworzącej rusztowanie białkowego kompleksu degradacyjnego, odpowiednio go aranżując wraz z białkiem APC, kinazą kazeiny 1 i GSK3. W sytuacji braku liganda Wnt, kinazy fosforylują N-koniec  $\beta$ -kateniny, co umożliwia jej rozpoznanie przez podjednostkę  $\beta$ -Trcp ligazy ubiquitynowej E3 i degradację w proteasomach (**Rycina 3A**).

W przypadku aktywacji ścieżki kanonicznej przez wiązanie Wnt z receptorem Frizzled i koreceptorami LRP-5 i -6 (ang. *Low Density Lipoprotein-Receptor Related Proteins*) dochodzi do rekrutacji białka Dvl (ang. *dishevelled*), fosforylacji koreceptorów LRP, a następnie rekrutacji do nich kompleksu aksyny. Zmiany te prowadzą do zahamowania mediowanej przez aksynę fosforylacji i degradacji  $\beta$ -kateniny. Stabilizacja i akumulacja  $\beta$ -kateniny w cytoplazmie komórki ułatwia jej transport do jądra komórkowego i poprzez tworzenie kompleksu z TCF/LEF, nasila ekspresję aktywowanych przez Wnt, różnych genów (**Rycina 3B**).



Rycina 3. Składniki drogi sygnałowej Wnt/ $\beta$ -katenina; wyłączona (A) i aktywowana (B) ścieżka kanoniczna drogi sygnałowej Wnt (na podstawie<sup>121</sup>, zmodyfikowany; opis w tekście).

Poszczególne ligandy Wnt (19 bogatych w cysteinę glikoprotein) zakwalifikowano do dwóch grup. Grupa pierwsza zawiera glikoproteiny transformujące o właściwości onkogennych związane ze ścieżką kanoniczną, m.in. Wnt-1, -3A, -8 i 8B. Drugą grupę stanowią glikoproteiny nietransformujące, aktywujące ścieżkę niekanoniczną, o działaniu przeciwnym do ligandów grupy pierwszej. Należą do niej Wnt-4, -5A i 11<sup>112</sup>. Przed sekrecją do przestrzeni pozakomórkowej białka Wnt przechodzą liczne modyfikacje w aparacie Golgiego (m.in. glikozylacja, palmitylacja N-końca) z udziałem białek transbłonowych<sup>113,114</sup>.

Receptor szlaku Wnt należy do jednego z dziesięciu białek z rodziny receptorów Frizzled (Fzd). Jest transbłonowym białkiem z siedmioma domenami, zbudowanym z 565 aa, identycznym w 56% z Fzd u *Drosophila*. Kodowany jest na 17 chromosomie - 17q21.1.<sup>115</sup>. Glikoproteiny Wnt dla aktywacji ścieżki oprócz wiązania się z receptorem Fzd, wymagają współdziałania dwóch koreceptorów, wspomnianych już białek LRP-5 i LRP6<sup>116,117</sup>. Interakcje białek Wnt z receptorem Fzd mogą być modulowane przez antagonistów receptora. Pierwszą grupę antagonistów stanowi rodzina białek sFRP (ang. *secreted frizzled-related protein*), białko WIF-1 (ang. *Wnt inhibitory factor-1*) i białko *Cerberus*. Wiążą się one z Wnt, co uniemożliwia im aktywację receptora Fzd i hamuje ścieżkę kanoniczną i niekanoniczną. Drugą grupę stanowi rodzina białek *Dickkopf-Dkk* oraz *Wise/SOST*, które przyłączają się do LRP-5 i LRP-6 i uniemożliwiają tworzenie kompleksu między receptorami Fzd i koreceptorami, hamując ścieżkę kanoniczną<sup>118</sup>. Białko *Dkk* przez interakcje z przezbłonowymi białkami *Kremen1* (Krm1) i *Kremen 2* (Krm 2) oraz z receptorem LRP-6 może tworzyć potrójny kompleks, promujący endocytozę receptora LPR-6 i w ten sposób ograniczać jego dostępność<sup>119</sup>. Białko *Shiza* hamuje szlak Wnt w innym mechanizmie, blokując transport receptora Fzd w obrębie ER. Hamujący wpływ na szlak Wnt wykazuje także kilka wielozadaniowych białek, m.in. białko *Nodal*, białko BMP (ang. *bone morphogenetic protein*) oraz IGFBP 4 (ang. *Insulin like-growth factor binding protein 4*). Białka *Nodal* i BMP łączą się z Wnt i w ten sposób uniemożliwiają jego interakcje z Fzd, natomiast IGFBP4 łącząc się z Fzd i LRP, blokując możliwość ich interakcji z Wnt.

Agonistami szlaku Wnt są białka *Norrin* i *R-spondin* (*Rspo*). Białko *Norrin* jest specyficznym ligandem dla Fzd 4<sup>120</sup>, *Rspo* działa synergistycznie z Wnt na receptory Fzd i LPR-6, ale szczegółowy mechanizm nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony.

Indukowana przez Wnt fosforylacja LRP jest kluczowym momentem aktywacji ścieżki kanonicznej. LRP-5 i -6 posiadają pięć motywów zawierających powtórzenia PPPSPxS (P-prolina, S-seryna lub treonina) i to one właśnie zostają fosforylowane przez GSK3 i CK (ang. *casein kinase*), stanowiąc miejsce łączenia z kompleksem aksyny. Ciekawy jest dualizm czynnościowy wyżej wymienionych kinaz, które przy braku aktywacji promują degradację  $\beta$ -kateniny, natomiast po stymulacji Wnt prowadzą w końcowym efekcie do jej akumulacji w cytoplazmie. Fosforylowane PPPSP aktywują kompleks aksyny. Dochodzi do fosforylacji kolejnych PPPSP, co stanowi mechanizm „wzmacniacza” ścieżki Wnt<sup>121</sup>.

Wzbudzenie ścieżki kanonicznej indukowanej przez Wnt odbywa się, jak wspomniano poprzez receptor Fzd, który tworzy kompleks Fzd-LRP-6. Fzd przez domenę PDZ werbuje cytoplazmatyczne białko *Dvl*. Białko to przez swoją domenę DIX oraz prawdopodobnie multimeryzację, werbuje kompleks białka aksyny i aktywuje GSK3 do fosforylacji znajdujących się wewnątrzkomórkowo motywów PPPSP koreceptora LRP. Prowadzi to do hamowania fosforylacji  $\beta$ -kateniny, jej eliminacji i kumulacji w cytoplazmie<sup>122</sup>. Białko *Dvl* posiada trzy konserwatywne domeny nazywane DIX, PDZ i DEP. Łączy się z nim około 18 białek DAPs (ang. *Dvl-associated proteins*). Należą do nich białka Nkd, Idax, Frodo, Dapper, GBP/Frat, Stbm, Daam1, Prickle, które mogą aktywować lub hamować sygnalizację Wnt<sup>123</sup>.

Cytoplazmatyczny poziom  $\beta$ -kateniny kontrolowany jest przez wielobiałkowy kompleks, którego rusztowaniem jest białko aksyna lub jego homolog - konduktyna (ang. *conductin*). Aksyna aranżuje kompleks białek biorących udział w fosforylacji i późniejszej degradacji  $\beta$ -kateniny. Oprócz  $\beta$ -kateniny posiada domeny wiążące białko APC, GSK3, CK1 $\alpha/\epsilon$ , białko *Dvl* i fosfatazę 2A (PP2A). Główną funkcją kompleksu jest promowanie fosforylacji N-końca  $\beta$ -kateniny, co umożliwia jej rozpoznanie przez  $\beta$ -TrCP - składnik ligazy ubikwitynowej E, a następnie degradację w proteasomach. Fosforylacja  $\beta$ -kateniny przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie następuje fosforylacja seryny w pozycji 45 (SER<sup>45</sup>) przez CK1 $\alpha/\epsilon$ , a następnie SER<sup>33</sup>, SER<sup>37</sup> i THR<sup>41</sup> przez GSK3. Dla skutecznej degradacji  $\beta$ -kateniny wszystkie cztery miejsca muszą ulec fosforylacji<sup>124</sup>. W regulacji fosforylacji  $\beta$ -kateniny bierze udział także białko *Diversin*. Posiada ono osiem powtórzeń fragmentu *ankyrin* na swoim N-końcu. Podczas gdy CK1 $\alpha$  wiąże się bezpośrednio z aksyną, CK1 $\epsilon$  wiąże się z fragmentem *ankyrin* białka *Diversin* formując kompleks degradacyjny. Aksyna wiąże się z *Diversin* w tym samym miejscu co z GSK3, jednak nie konkurują ze sobą, lecz tworzą wspólny kompleks zwiększający

ich aktywność. *Diversin* ułatwiając fosforylację  $\beta$ -kateniny, hamuje ścieżkę kanoniczną Wnt<sup>125</sup>. Cytoplazmatyczny poziom  $\beta$ -kateniny kontroluje również białko WTX (ang. *Wilms tumor gene*)<sup>126</sup>. Kodujący go gen znajduje się na chromosomie X, a jego brak występuje u dzieci z guzem Wilmsa. WTX wiąże się z aksyną, APC,  $\beta$ -kateniną i  $\beta$ -TrCP ułatwiając degradację  $\beta$ -kateniny. Aksyna poprzez wiązanie z CK1 ułatwia także fosforylację białka APC, co zwiększa jego aktywność. Natomiast GSK3 jako wielozadaniowy enzym, odpowiada za fosforylację wielu białek, m.in. APC i aksyny, zwiększając ich aktywność. Hamowanie GSK3 może zachodzić poprzez białko wiążące GSK3 – GBP (ang. *GSK binding protein*). Mutacje czy zmiany ekspresji genów GSK3 nie są częstym zjawiskiem znajdowanym w guzach nowotworowych<sup>127</sup>. Fosforylacja  $\beta$ -kateniny przez GSK3 jest znacznie bardziej wydajna w obecności aksyny, a nadekspresja konduktyny znacząco zwiększa degradację  $\beta$ -kateniny. Aksyna i konduktyna w 45% zbudowane są z tych samych aminokwasów, wykazują różną ekspresję w rozwoju embrionalnym, z wszechobecną aksyną i ściśle określoną lokalizacją konduktyny w niektórych tylko tkankach. Ekspresja konduktyny w przeciwieństwie do aksyny jest często podwyższona w guzach okrężnicy, wątroby czy jajnika. Promotor genu konduktyny zawiera funkcjonalnie miejsce wiązania TCF. Konduktyna stanowi element ujemnego sprzężenia zwrotnego związanego z cytoplazmatyczną akumulacją  $\beta$ -kateniny. Zwiększona ekspresja konduktyny może być użytecznym wczesnym markerem diagnostycznym niektórych nowotworów indukowanych szlakiem Wnt/ $\beta$ -katenina<sup>128</sup>.

Kolejnym białkiem biorącym udział w tworzeniu kompleksu destrukcyjnego  $\beta$ -kateniny jest białko APC. Mutacja genu APC została zidentyfikowana w rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (ang. *familial adenomatous polyposis, FAP*), wrodzonej chorobie charakteryzującej się rozwojem tysięcy polipów jelita grubego, prowadzącej do rozwoju raka okrężnicy. Gen APC zawiera 21 egzonów kodujących 2843 aa. W centralnej części APC zawiera trzy 15-aa i siedem 20-aa powtórzeń. Stanowią one miejsca wiązania  $\beta$ -kateniny. Trzy powtórzenia aminokwasowe zawierające w swoim rdzeniu tzw. motyw SAMP (SER-ALA-MET-PRO), są odpowiedzialne za interakcje z domeną aksyny. Posiadają znaczącą homologię do rodziny regulatorów sygnalizacji białka G (RGS)<sup>129</sup>. Mutacja APC w FAP znajdowała się najczęściej w pobliżu końca 5' sekwencji kodującej pierwsze powtórzenie SAMP, powodując wypadnięcie połowy C-końca APC, gdzie znajdują się miejsca łączenia z aksyną czy konduktyną prowadząc do stabilizacji poziomu  $\beta$ -kateniny. Utrata tej części białka, powoduje

także utratę kilku sekwencji NES (ang. *Nuclear Export Signal*) istotnych w dystrybucji APC pomiędzy jądrem komórki a cytoplazmą. Może to mieć podstawowe znaczenie dla działania APC, które zwiększa eksport  $\beta$ -kateniny z jądra komórki i hamuje tym samym jej wpływ na transkrypcję genów<sup>130</sup>. Sugeruje się, że APC może także ochraniać  $\beta$ -kateninę przed defosforylacją katalizowaną przez PP2A. Może też ułatwiać usuwanie fosforylowanej  $\beta$ -kateniny z połączeń z aksyną i w ten sposób ułatwiać jej degradację i tworzenie miejsca dla nowego cyklu fosforylacji  $\beta$ -kateniny.

W funkcjonowaniu kanonicznej ścieżki szlaku Wnt podstawowe znaczenie ma cytoplazmatyczna stabilizacja i akumulacja  $\beta$ -kateniny, jej transport do jądra komórkowego, połączenie  $\beta$ -kateniny z czynnikiem transkrypcyjnym TCF/LEF i aktywacja transkrypcji genów zwi Hzanych ze  cie kH Wnt. JHdrowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny jest niezbędnym regulacyjnym składnikiem kanonicznej drogi Wnt, jednak dokładny mechanizm transportu  $\beta$ -kateniny do jądra nie jest w pełni wyjaśniony. Wcześniejsze badania sugerują udział w tym procesie NLS (ang. *Nuclear Localisation Signal*), niezależnie od udziału białka *importin*, lecz w wyniku bezpośredniej interakcji z białkami porów błony jądrowej<sup>131</sup>.  $\beta$ -katenina ulega przemieszczeniu także w odwrotnym kierunku z jądra komórki do cytoplazmy. Eksport ten odbywa się w połączeniu z białkami APC, aksyną<sup>132</sup> i RanBP3 (ang. *Ran binding protein 3*)<sup>133</sup>. Przemieszczenie  $\beta$ -kateniny z jądra komórkowego do cytoplazmy uniemożliwia aktywację transkrypcji genów zależnych od Wnt i prowadzi do jej degradacji. Badania obrazowe żywych komórek dowodzą, że aksyna i APC zwiększają cytoplazmatyczną, a TCF4 i BCL9/Pygopus - jądrową ekspresję  $\beta$ -kateniny, lecz jest to raczej efektem gromadzenia jej w odpowiednim kompartmentcie ni  zwiększenia transportu<sup>134</sup>. Nowe badania wskazują na konieczno c aktywacji małych GTPaz – Rac-1 (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) w procesie jądrowej kumulacji  $\beta$ -kateniny. Tworzą one razem z JNK2 (ang. *Jun N terminal kinase 2*) i  $\beta$ -kateniną potrójny cytoplazmatyczny kompleks powodując fosforylację SER<sup>191</sup> i SER<sup>605</sup> w cząsteczce  $\beta$ -kateniny, ułatwiając jej w ten sposób transport do jądra komórki<sup>135</sup>. Po przemieszczeniu do jądra komórki,  $\beta$ -katenina wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi TCF/LEF należnymi do białek HMG *box* (ang. *High Mobility Group box*). Białka te poprzez swoją domenę wiążą się z DNA i biorą udział w kontroli transkrypcji, replikacji, naprawy łańcuchów DNA oraz w procesach związanych ze skręcaniem i rozwijaniem nici DNA. U bezkręgowców stwierdzono jedynie jeden gen kodujący TCF, natomiast u ssaków występują

cztery (TCF1, LEF1, TCF3 i TCF4). Wiążą się one z sekwencjami DNA nazywanymi WRE (ang. *Wnt responsive element*) C/T-C-T-T-T-G-A/T-A/T. W przypadku braku stymulacji Wnt i nieobecności  $\beta$ -kateniny w jądrze komórki, TCF/LEF hamuje transkrypcję Wnt-zależnych genów. Jest więc jej inhibitorem, natomiast po połączeniu z  $\beta$ -kateniną promuje ich transkrypcję stając się jej aktywatorem. TCF/LEF posiada cztery domeny, N-końcową wiążącą  $\beta$ -kateninę, domenę centralną, domenę HMG wiążącą DNA, która zawiera także sekwencje sygnałową NLS oraz długi odcinek C-końcowy<sup>136</sup>. Drugim elementem współdziałającym z TCF w hamowaniu transkrypcji Wnt-zależnych białek, są białka *Groucho* (Grg-1-2-3-4-5) u *Drosophila*, i homologiczne białka u ssaków, tj. TLE-1-2-3-4 (ang. *For transducin-like enhancer split*) i hAES (ang. *For amine terminated enhancer split*). Tzw. „długi” *Groucho-1-2-3-4* zawierający pięć domen jest represorem transkrypcji, natomiast „krótki” *Grg-5* i *hAES*, które zawierają jedynie dwie domeny, nie wykazują właściwości korepresyjnych a wręcz przeciwnie, promują szlak Wnt. Mechanizm hamujący transkrypcję poprzez *Groucho/TLE* jest powiązany z histonową deacetylazą RPD3 z większej grupy *HDAC-1* (ang. *histone deacetylase*). Połączenie deacetylazy z promotorem genu powoduje zmianę struktury chromatyny, przez usunięcie grupy acylowej z lizyny znajdującej się na N-końcu łańcucha rdzenia histonu, co skutkuje powstaniem bardziej zwartej struktury chromatyny i represją transkrypcji<sup>137</sup>. Przyłączenie  $\beta$ -kateniny do TCF odwraca represję i promuje transkrypcję.

Odkryto wiele koaktywatorów kompleksu TCF/ $\beta$ -katenina, łączących się z obydwoma końcami  $\beta$ -kateniny. Do końca NH<sub>2</sub>  $\beta$ -kateniny łączą się białka Legless/BCL9 (Lgs) i Pygopus<sup>138</sup>. Natomiast do końca COOH  $\beta$ -kateniny przyłączają się białka związane z remodelingiem chromatyny jak - p300/ CBP (ang. *CREB binding protein*)<sup>139</sup>, Brg-1<sup>140</sup>, TRRAP (ang. *transformation/transcription domain-associated protein*) i MLL1/MLL2 (ang. *mixed lineage leukemia*)<sup>141</sup> oraz białka uczestniczące w inicjacji transkrypcji jak parafibromin/hyrax - komponenty kompleksu *Paf1* (ang. *polymerase-associated factor*)<sup>142</sup>, TBP (ang. *TATA binding protein*)<sup>143</sup> czy helikazy *Pontin52* i *Reptin52*<sup>144</sup>.

Białkami hamującymi i wyłączającymi transkrypcję Wnt-zależnych genów są białka APC i CtBP (ang. *C-terminal binding protein*). Mechanizm ich działania może być dwójaki. Pierwszy związany jest z połączeniem APC i CtBP z  $\beta$ -kateniną oraz odwróceniem jej połączenia z TCF<sup>145</sup>. Drugi, w którym CtBP wiąże się z bezpośrednio z TCF, hamując ekspresję

odpowiednich genów<sup>146</sup>. Ponowne wyłączenie genów związane jest ze stabilnym połączeniem z białkami *Groucho* i HDAC-1.

Kompleks TCF/ $\beta$ -katenina aktywuje ponad 130 genów regulujących wiele podstawowych funkcji komórki, m.in. proliferację, różnicowanie i aktywność komórek macierzystych. Interesującym jest fakt, że wśród nich są także geny składników szlaku Wnt jak Fzd, LRP-6, konduktyna (aksyna-2), TCF/LEF, antagonistą *Dvl* – białko *Naked*, białka *DKK1* i *Rspo*. W ten sposób za pomocą sprzężenia zwrotnego dochodzi do regulacji działania szlaku. Indukcja konduktyny, *DKK1* i *Naked* oraz supresja Fzd i LRP-6 tworzy ujemne sprzężenie zwrotne, zaś indukcja *Rspo* i TCF/LEF dodatkowo, wzmacniające Wnt, opisane m.in. w kancerogenezie jelita grubego<sup>147</sup>.

Do najbardziej znanych onkogenów kontrolowanych przez kompleks Wnt/ $\beta$ -katenina należą C-myc i cyklina D1, których promotory posiadają miejsce wiązania TCF<sup>148,149</sup>. Zwiększona aktywność C-myc prowadzi do hamowania białka p21, inhibitora kinazy zależnej od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase*, *CDK*), co stymuluje progresję cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub>/S<sup>150</sup>. Cyklina D1 łącząc się z CDK4, aktywuje bezpośrednio fazę G<sub>1</sub> cyklu komórkowego. Na modelu mysim obserwowano wzrost frakcji cytozolowej i jądrowej  $\beta$ -kateniny, który był związany z nasiloną proliferacją komórek nabłonka jelita grubego. Prowadziło to do subkomórkowych przesunięć lokalizacji tego białka i nasilonej ekspresji C-myc i cykliny D1<sup>151</sup>. Zaburzenie regulacji Wnt może prowadzić do kumulacji nieprawidłowych, posiadających defekty genomu komórek także na skutek zahamowania apoptozy. Białko *surwiwina* (ang. *Survivin*) jest antyapoptotycznym białkiem, którego promotor posiada trzy miejsca wiązania TCF-TBE (ang. *TCF binding elements*). Kompleks TCF/ $\beta$ -katenina zwiększa ekspresję genu *surwiwiny* 6 do 12 razy w rakach jelita grubego, co ochrania komórki przed apoptozą indukowaną ultrafioletem<sup>152</sup>. Wnt może ułatwiać proliferację komórkową przez wzrost ekspresji czynników wzrostu i ich receptorów. W rakach okrężnicy i odbytnicy obserwowano podwyższony poziom FGF-18 i aktywację promotora jego genu przez kompleks TCF/ $\beta$ -katenina<sup>153</sup>. Natomiast wzrost poziomu C-MET (ang. *Mesenchymal epithelial transition factor*) opisano u pacjentów z zespołem polipowatości rodzinnej, a jego obniżenie w komórkach raka jelita grubego po eksperymentalnym zablokowaniu TCF. Kinaza tyrozyny C-MET jest receptorem HGF (ang. *hepatocyte growth factor*), który promuje proliferację komórek, ich ruchliwość i inwazyjność<sup>154</sup>. Stymulację angiogenezy, niezbędnej dla wzrostu i tworzenia



przerzutów guza, powodował zaś podwyższony poziom VEGF w rakach kolorektalnych, spowodowany także działaniem kompleksu TCF/ $\beta$ -katenina<sup>155</sup>. Geny kodujące kilka proteaz związanych rozkładem macierzy zewnątrzkomórkowej, jak metaloproteiny, tj. *matrylisin*/MMP7 i MMP26 są związane ze ścieżką kanoniczną. Ułatwiają one naciekanie i wzrost guzów, a co ciekawe największa jądrowa kumulacja  $\beta$ -kateniny razem z MMP-7 obecna jest w miejscu tzw. frontu inwazyjnego raków jelita grubego<sup>156</sup>.

Zdolność do przemieszczania i tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe jest także związana ze stymulacją ekspresji białek adhezyjnych i macierzy pozakomórkowej w sposób TCF-zależny. Białko CD44 biorące udział w tworzeniu przerzutów przez jego interakcje z proteoglikanami, wykazuje znacznie zwiększoną ekspresję w skupieniach nieprawidłowych dysplastycznych komórek krypt jelitowych, jak i raków jelita a jego synteza regulowana jest przez układ białek TCF<sup>157</sup>.

$\beta$ -katenina i jej analog plakoglobina indukują także ekspresję białka NrCAM (ang. *neural cell adhesion molecule*) w rakach jelita grubego i czerniaka. Jako cząsteczka adhezyjna należy ono do nadrodziny immunoglobulin i występuje także poza układem nerwowym. Bierze udział w komunikacji międzykomórkowej. Jest elementem regulującym migrację komórek poprzez sygnalizację pomiędzy wewnątrzkomórkową domeną a aktywną cytoszkieletu<sup>158</sup>. Także promotor genu łańcucha  $\gamma$ 2 lamininy-5 (Ln5- $\gamma$ 2) zawiera miejsce wiązania TCF i jego ekspresja związana jest ze szlakiem kanonicznym Wnt. Laminina  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  tworzy heterodimerowy kompleks, który jest podstawową glikoproteiną przestrzeni międzykomórkowej - blaszki jasnej w błonie podstawnej. Syntetyzowana przez komórki nabłonkowe, bierze udział w regulacji różnicowania, podziałów i migracji komórek oraz sygnalizacji międzykomórkowej. Łańcuch  $\gamma$  wykrywany jest często w złośliwych guzach, a jego ekspresja jest traktowana jako zły prognostyk złośliwości<sup>159</sup>.

## 9.2. Szlak Wnt/ $\beta$ -katenina a hepatokancerogeneza

Udział kanonicznej i niekanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt/Fzd w hepatokancerogenezie jest opisywany przez różnych badaczy<sup>160,161,162,163,164,165,166,167,168</sup>. Jednym z najczęściej opisywanych mechanizmów aktywacji kanonicznej ścieżki sygnałowej w HCC jest aktywacja  $\beta$ -kateniny poprzez mutacje genu CTNNB1. Towarzyszy temu nadekspresja/represja innych

genów zaangażowanych w przekazywanie sygnałów do jądra komórkowego, co skutkuje zwiększoną komórkową proliferacją, migracją i inwazją komórek.

Cechą charakterystyczną na poziomie molekularnym, opisywaną w HCC i *hepatoblastoma* (u dzieci) jest jądrowa lub cytoplazmatyczna akumulacja  $\beta$ -kateniny, obserwowana przynajmniej w części tych raków<sup>161,164,165,169</sup>. Wykazywano związek takiej lokalizacji białka z bardziej nasiloną aktywnością proliferacyjną hepatocytów oraz krótszym czasem przeżycia pacjentów<sup>165</sup> lub wręcz przeciwnie - mniejszą inwazyjnością HCC i dłuższym 5-letnim czasem przeżycia<sup>163</sup>. Dostyć wcześnie zasugerowano inną rolę endogennej (*wild-type*)  $\beta$ -kateniny w porównaniu z jej formą zmutowaną. Zmutowana forma tego białka miałaby być obecna w podtypach HCC o lepszej prognozie<sup>163</sup>. Jądrowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny może być indukowana ścieżką sygnałową TGF- $\beta$ , odpowiadając za transdyferencjację neoplastycznych hepatocytów do niedojrzałych komórek progenitorowych wątroby<sup>167</sup>. Obserwowano przy tym korelację między jądrową ekspresją  $\beta$ -kateniny a inwazją guza czy nawrotami HCC po przeszczepie wątroby<sup>167</sup>. W przypadku HCC opisywano także duży odsetek chorych (62%) z niejądrową akumulacją  $\beta$ -kateniny (cytoplazma/błony komórkowe), wskazując na heterogenne mechanizmy prowadzące do nadekspresji tego białka w HCC<sup>164</sup>.

Częstość mutacji genu  $\beta$ -kateniny w HCC waha się od 8-30%<sup>164,168</sup>, choć podawane są i wyższe odsetki – powyżej 40% HCC<sup>169</sup>. Taniguchi i wsp. mutacje genu *CTNNB1* wykrył w 19% HCC i w 70% *hepatoblastoma*. Były to głównie mutacje punktowe, a ponad połowa z *hepatoblastoma* miała delecje. Około połowa HCC z mutacjami aksyny 1 i konduktyny wykazywała akumulację  $\beta$ -kateniny w jądrze komórkowym, cytoplazmie lub na błonach komórkowych<sup>170</sup>.

Większość obserwacji wskazuje na fakt, iż mutacje w obrębie *CTNNB1* występują w późniejszym okresie rozwoju raka wątroby, a jądrową akumulację  $\beta$ -kateniny wykrywano we wczesnych stadiach HCC, sugerując inne, poza mutacjami mechanizmy stabilizacji tego białka<sup>162,171,172</sup>. Na modelu myszy transgenicznym wykazano jądrową lokalizację  $\beta$ -kateniny tylko w postaciach histologicznych *adenoma* oraz wysoko zróżnicowanych rakach o fenotypie eozynofilowym, co również wskazywało na fakt, iż aktywacja szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina z translokacją białka do jądra komórkowego jest wczesnym etapem kancerogenezy<sup>173</sup>.

Z biegiem lat i wykonywanych badań wyróżniono dwa podtypy HCC, w zależności od molekularnych zmian dotyczących szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina. Pierwszy - z mutacją *CTNNB1*

charakteryzuje się wzmożoną ekspresją wątrobowo-specyficznych „celów” (ang. *target*). HCC tej podgrupy są dobrze zróżnicowanymi guzami, o niskim stopniu złośliwości histologicznej, ze stabilnością chromosomów i dobrą prognozą. W drugim podtypie HCC, gdzie również jest aktywowana ścieżka Wnt/ $\beta$ -katenina, nie stwierdza się mutacji  $\beta$ -kateniny. Guzy te charakteryzują się dużą dysregulacją funkcji klasycznych białek szlaku Wnt, znacznym stopniem niestabilności chromosomów, agresywnym fenotypem i związane są preferencyjnie z zakażeniem HBV<sup>172,174</sup>.

Co ciekawe - choć udział  $\beta$ -kateniny jest kluczowy w rozwoju embrionalnym wątroby i w procesach regeneracji narządu<sup>175</sup>, aktywacja samej  $\beta$ -kateniny nie wystarcza do zainicjowania *per se* procesu hepatokancerogenezy, co wykazano na modelach zwierzęcych<sup>168,176</sup>. Obserwowano jedynie przejściową hyperplazję hepatocytów, bez rozwoju ognisk nowotworzenia<sup>176</sup>.

Aktywowana  $\beta$ -katenina może natomiast współpracować z innymi ścieżkami onkogenezy, takimi jak insulina/IGF-1/IRS-1/MAPK, H-RAS, MET, AKT czy ze związkami chemicznymi, które inicjują kancerogenezę, jak to obserwowano na modelu mysim<sup>176,177</sup>. Eksperymentalnie wykazano również, iż zmutowana forma  $\beta$ -kateniny nie wystarcza do zapoczątkowania procesu tworzenia HCC, choć go promuje w inny sposób (zwiększanie niestabilności chromosomów, wzmacnianie działania innych onkogenów)<sup>168</sup>. Co zdumiewające, wykazano nawet zjawisko 7-krotnego wzrostu formowania guzów wątroby u myszy pozbawionych genu  $\beta$ -kateniny (z nokautem *CTNBI*) w porównaniu z kontrolą<sup>178</sup>. Paradoksalnym wydaje się fakt, że zarówno obecność zmutowanej formy  $\beta$ -kateniny, jak i brak  $\beta$ -kateniny (*wild type*) nasila indukowaną poprzez DEN (ang. *diethylnitrosamine*) hepatokancerogenezę u myszy<sup>168</sup>. Mechanizmy tworzenia HCC u myszy z nokautem genu  $\beta$ -kateniny są nieznane.

Ostatnie badania wskazują również na udział szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w procesie samoodnowy (ang. *self-renewal*) i ekspansji wątrobowych komórek macierzystych inicjujących rozwój HCC (tzw. *liver cancer stem cells, CSCs*). Zaburzenia ekspresji  $\beta$ -kateniny mogą więc prowadzić do rozwoju HCC przez jej regulujący wpływ na komórki macierzyste i powstanie specyficznie wątrobowych CSCs. Istnieją dowody eksperymentalne na preferencyjną aktywację szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina także w obrębie puli komórek macierzystych dojrzałej wątroby, zwanych komórkami owalnymi (ang. *oval cells*) lub progenitorowymi komórkami wątroby (ang. *hepatic progenitor cells, HPCs*) w regenerującej wątrobie<sup>179</sup>. Podobnie ścieżki sygnałowe TGF- $\beta$ ,

Notch i Hedgehog są elementami kontroli różnicowania, dojrzewania i proliferacji komórek macierzystych, które biorą udział w procesach regeneracji<sup>180</sup>. Jako komórki progenitorowe posiadają zdolność do niepostrzeżonego podziału, co czyni je podobnymi do komórek rakowych i sugeruje, że zaburzenie ścisłego nadzoru nad ich podziałami może być przyczyną rozwoju HCC. Fakt ten potwierdzono badaniami na modelach zwierzęcych<sup>181</sup>. Choroby wątroby prowadzące do rozwoju raka często także prowadzą do aktywacji HPCs, co może sugerować, że ta właśnie grupa komórek jest punktem wyjścia do rozwoju raka<sup>182</sup>. W znacznym odsetku HCC stwierdza się jeden lub więcej markerów HPCs, które są nieobecne w normalnych dojrzałych hepatocytach<sup>183,184</sup>. W stymulowanych do proliferacji komórkach owalnych stwierdzono wzrost indukowanej przez Wnt-3 defosforylowanej  $\beta$ -kateniny w jądrze komórkowym i zwiększoną aktywność transkrypcyjną szlaku WNT/ $\beta$ -katenina/TCF oraz aktywację cyklu komórkowego<sup>185</sup>. W innym badaniu, w którym indukowano aktywację komórek owalnych u gryzoni, stwierdzono zwiększoną ilość całkowitej i aktywnej (defosforylowanej) formy  $\beta$ -kateniny, zlokalizowanej w cytoplazmie i jądrze komórkowym, choć w otaczających hepatocytach dominowała lokalizacja błonowa. Zwiększonej ekspresji  $\beta$ -kateniny towarzyszyło zwiększenie Wnt-1 w sąsiadujących hepatocytach oraz zwiększona ekspresja receptora Fz-2 w komórkach owalnych i jednocześnie zmniejszenie WIF-1, inhibitora Wnt. Dodatkowym dowodem na udział szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w proliferacji komórek owalnych było zaobserwowanie dramatycznego zmniejszenia liczby tych komórek w wątrobie gryzoni pozbawionych genu  $\beta$ -kateniny w komórkach HepCTNMB1<sup>-/-</sup><sup>186</sup>.

Sygnaly szlaku Wnt/  $\beta$ -katenina mogą także wpływać na mikrośrodowisko HCC i w ten sposób odgrywać rolę w przeżyciu i wzroście komórek neoplastycznych<sup>168</sup>.

$\beta$ -katenina i E-kadheryna jako składniki drogi sygnałowej Wnt, znalazły się również na liście surowiczych markerów hepatokancerogenezy<sup>187</sup>. Obserwowano znacząco wyższe stężenia 4 białek, w tym  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w surowicy krwi pacjentów z HCC (związanych etiologicznie z zakażeniem genotypem 4 HCV) i z marskością wątroby w porównaniu z chorymi z przewlekłym zakażeniem HCV i kontrolą<sup>187</sup>. Stężenie samej  $\beta$ -kateniny było istotnie wyższe w HCC w porównaniu z marskością wątroby i pozostałymi grupami badanych chorych. Uznano je w tych badaniach za bardziej specyficzny i czulszy marker w różnicowaniu HCC i marskości wątroby niż rozpuszczalną formę cząsteczki ICAM-1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*).

Reasumując najnowsze dane na temat roli ścieżki Wnt/ $\beta$ -katenina w hepatokancerogenezie, można uznać, że obie drogi Wnt - kanoniczna i niekanoniczna są komplementarne w tym procesie, przy czym  $\beta$ -katenina wydaje się być ważna w inicjowaniu wątrobowej onkogenezy, a w dalszych etapach uruchamiana jest niekanoniczna ścieżka tego szlaku<sup>168</sup>.

#### 9.2.1. Szlak Wnt/ $\beta$ -katenina w hepatokancerogenezie na tle zakażenia HCV

Badania na udziale HCV w kancerogenezie wątrobowej poprzez modulowanie drogi sygnałowej Wnt/ $\beta$ -katenina są prowadzone od lat 90-tych XX wieku. Początkowo wykazywano obecność jądrowej akumulacji  $\beta$ -kateniny w HCC na tle zakażenia HCV w powiązaniu z mutacjami genu  $\beta$ -kateniny, które obserwowano w zmiennym odsetku pacjentów z HCC<sup>162</sup>. Dopiero badania w modelu *in vitro* pozwoliły na wyjaśnienie interakcji białek HCV i drogi sygnałowej Wnt/ $\beta$ -katenina. I tak, na liniach hodowanych komórek HCC (HepG2) wykazano, że zarówno samo białko NS5A, jak i cała poliproteina HCV odpowiada za wzrost poziomu  $\beta$ -kateniny (akumulacja i stabilizacja białka, zmniejszona degradacja w proteasomach) w komórkach z ekspresją tych produktów genomu HCV. Następowo to w mechanizmie redukcji aktywności czynnika transkrypcyjnego FKHR (ang. *Forkhead Transcription Factor*) i wzrostu fosforylacji GSK-3 $\beta$  (zahamowania aktywności enzymu)<sup>98</sup>. Podwyższony poziom  $\beta$ -kateniny w komórce wynikał więc z aktywacji ścieżki PI3K/Akt. Prowadziło to do zwiększonej transkrypcji genów zależnych od  $\beta$ -kateniny i miałooby ułatwiać nowotworową transformację HCV-zakażonych hepatocytów. Udział białka NS5A w aktywacji drogi sygnałowej Wnt/ $\beta$ -kateniny potwierdzono w późniejszych badaniach<sup>188</sup>, gdzie wykazano bezpośrednią aktywację endogennej niefosforylowanej *wild-type*  $\beta$ -kateniny przez białko NS5A i kolokalizację obu białek w cytoplazmie komórek HepG2. Został potwierdzony mechanizm akumulacji  $\beta$ -kateniny na poziomie białka, tj. również poprzez inaktywację GSK-3 $\beta$ . Dodatkowo badacze ci dowiedli, że białko NS5A może bezpośrednio współdziałać z  $\beta$ -kateniną poprzez swój koniec aminowy i region ARM 1-6  $\beta$ -kateniny<sup>188</sup>. Autorom udało się również wykazać, że koniec aminowy NS5A działa na TCF-4-zależną aktywność transkrypcyjną. Aktywację ścieżki Wnt/ $\beta$ -katenina w liniach komórkowych *hepatoma* wykazano niedawno również oddzielnie dla białka rdzeniowego (białko C) HCV<sup>189</sup>. Podobnie jak w przypadku białka NS5A, również białko rdzeniowe HCV zwiększało TCF-zależną aktywność transkrypcyjną, nasilało ekspresję i stabilizowało  $\beta$ -kateninę na poziomie białka w komórkach Huh7 poprzez inaktywację GSK-3 $\beta$ .

Było odpowiedzialne za zwiększenie proliferacji komórkowej i promocję wzrostu guza wątroby wskutek dodania do hodowanych komórek jednego z ligandów szlaku Wnt, białka Wnt-3A<sup>189</sup>.

HCV wpływa również dwójako na ekspresję E-kadheryny, pośrednio przez modulację ścieżki Wnt/ $\beta$ -katenina, a udział bezpośredni zależny jest od białka rdzeniowego HCV. Białko C zmniejsza ekspresję E-kadheryny na poziomie transkrypcyjnym poprzez hypermetylację wysp CpG w promotorze genu CDH1 i hamowanie w ten sposób jej syntezy<sup>190,191</sup>.

Niedawne badania dowodzą udziału HCV również w przemianie nabłonkowo-mezenchymatycznej (*ang. epithelial-mesenchymal transition*, EMT), opisanej w dalszej części Wstępu. W hodowli komórek pierwotnego raka wątroby zakażonych genotypem 1b lub 2a HCV wykazano wzrost ekspresji licznych markerów EMT, m.in. wimentyny, białek: snail, slug i twist oraz spadek ekspresji E-kadheryny. Hepatocyty zakażone HCV zmieniały fenotyp, cechowały się wyższą ekspresją białka specyficznego dla fibroblastów 1 (*ang. fibroblast-specific protein 1*, FSP-1) i miały wyższe poziomy fosforylowanej (a więc aktywnej)  $\beta$ -kateniny (Ser<sup>552</sup>)<sup>192</sup>.

## 10. Rola kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina w fizjologii i patologii

### 10.1. Kompleks kadheryna/katenina jako nabłonkowa bariera

$\beta$ -katenina pełni w komórce podwójną rolę. Oprócz opisanej wcześniej kanonicznej ścieżki szlaku Wnt, gdzie reguluje transkrypcję wielu genów biorących udział w proliferacji i różnicowaniu komórek, pełni także rolę w kontroli przylegania i migracji komórek, jako element budujący połączenia międzykomórkowe w kompleksie z E-kadheryną<sup>193</sup>. Połączenia międzykomórkowe determinują ich polarność, są niezbędnym elementem pozwalającym na integralność tkanek, ich rozwój i dojrzewanie. Umożliwiają interakcje i przekazywanie sygnałów pomiędzy sąsiadującymi komórkami oraz między nimi a macierzą pozakomórkową. Osłabienie przylegania komórkowego może prowadzić do zaburzenia kontroli cyklu komórkowego, do oddzielenia pojedynczych komórek od ogniska pierwotnego, co stwarza warunki do powstawania przerzutów nowotworowych. Cząsteczki adhezyjne w komórkach nowotworowych umożliwiają przyleganie i przechodzenie przez ścianę naczynia oraz stymulują angiogenezę ułatwiając tworzenie ogniska przerzutowego<sup>194</sup>.

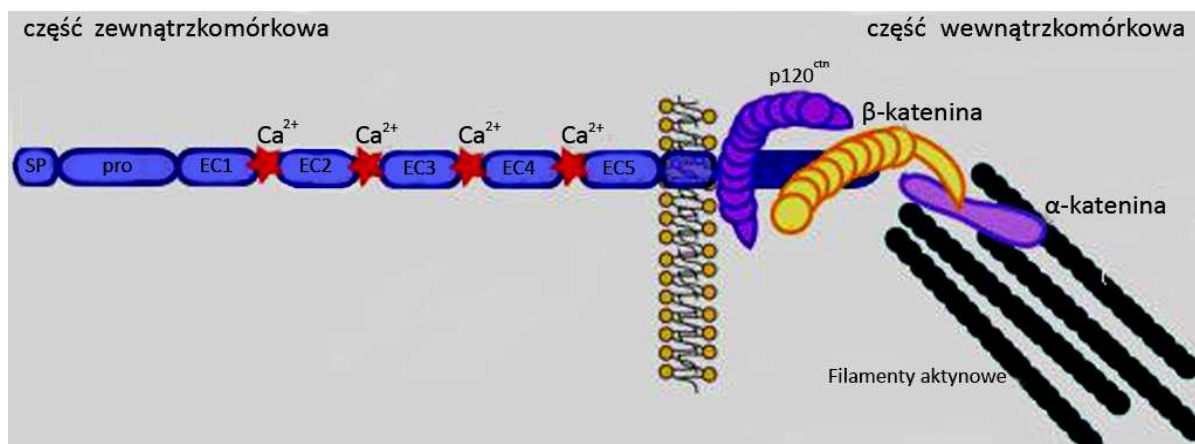
Za adhezję komórkową odpowiedzialne są komórkowe cząsteczki adhezyjne (*ang. cell adhesion molecules*, CAMs). Znanych jest około sto różnych cząstek CAMs, które na podstawie

różnic w budowie molekularnej zaklasyfikowano do pięciu rodzin: kadheryn, integryn, selektyn, cząsteczek z nadrodziny immunoglobulin I-CAM, oraz antygenu różnicowania komórkowego, CD44<sup>191,195</sup>.

Kadheryny nie są jednorodną grupą białek. Zostały po raz pierwszy zidentyfikowane około 30 lat temu. Molekularna analiza pozwoliła zidentyfikować całą rodzinę kadheryn posiadających w swojej zewnątrzkomórkowej części powtórzenia (ang. *cadherin-repeats* EC1-EC5), swoistą domenę tzw. motyw. Zawiera on ujemnie naładowane sekwencje DRE, DXNDNAPXF, DXD, odpowiadając za wiązanie jonów wapnia. Wzrost poziomu  $Ca^{+2}$  powoduje wzrost sztywności cząsteczki, a następnie wiązanie do homologicznej kadheryny sąsiadującej komórki, wapń jest więc niezbędny dla odpowiedniego funkcjonowania kadheryn. Cytoplazmatyczna domena klasycznych kadheryn jest wysoce konserwatywna. Miejsce wiązania katenin (ang. *catenin-binding site*) zostało zmapowane na 72-aa C-końca cząsteczki E-kadheryny. Cytoplazmatyczny „ogon” E-kadheryny, nie tylko uczestniczy w interakcjach z białkami cytoplazmatycznymi, ale również reguluje funkcje kadheryn<sup>191,195</sup>.

Nadrodzina kadheryn obejmuje sześć podrodzin. Należą do nich kadheryny klasyczne (typu I), atypowe (typu II), występujące w desmosomach - desmogleina i desmogleina, protokadheryny i kadheryna *Flamingo*. Dodatkowo kilka kadheryn zajmuje odrębne niesklasyfikowane miejsce w superrodzinie kadheryn. Należą tu kadheryna 13, -15, -16, -17, Dachsous, RET, FAT MEGF-1 oraz większość kadheryn bezkręgowców<sup>196</sup>.

Nabłonkowa E-kadheryna była pierwszą zidentyfikowaną kadheryną i liczne badania pozwoliły wyjaśnić wiele mechanizmów regulujących jej aktywność. Występuje w połączeniach przylegających (ang. *adherens junctions*) komórek nabłonkowych. Należy ona do klasycznych kadheryn obok N-kadheryny, występującej w tkance nerwowej, P w łożysku i R w siatkówce. Kadheryny są, jak wspomniano glikoproteinami składającymi się z części wewnątrzkomórkowej, przezbłonowej i zewnątrzkomórkowej. Biorą udział w zależnej od jonów wapnia regulacji adhezji komórkowej, ale także w regulacji tkankowej morfogenezy, rozpoznaniu i grupowaniu odpowiednich komórek i utrzymywaniu spójności tkanek oraz koordynacji przemieszczania komórek<sup>197</sup>.  $\beta$ -katenina wiąże cytoplazmatyczną domenę kadheryny typu I i przez połączenie z  $\alpha$ -kateniną łączy ją z aktywną cytoszkieletem (**Rycina 4**).



Rycina 4. Schemat cząsteczki E-kadheryny (SP-pro-EC1-EC5) i kompleksu E-kadheryna/β-katenina (na podstawie<sup>198</sup>, zmodyfikowany; opis w tekście).

Do błonowej domeny kadheryny wiąże się następane białko posiadające w swojej budowie powtórzenia *armadillo* (białko p120). Jest ono niezbędne dla stabilizacji E-kadheryny oraz pełni funkcje regulujące połączenia kadheryny z cytoszkieletem przez interakcje z małymi GTP-azami z rodziny Rho. Białko p120 jest czynnikiem regulującym cykl kadheryn. W jego obecności kompleks kadheryny jest stabilny, natomiast brak p120 powoduje usunięcie kadheryny z powierzchni komórki przez internalizację, a następnie degradację w drodze endocytozy lub recykling z powrotem na powierzchnię komórki<sup>199</sup>.

Połączenie kadheryny z β-kateniną oraz pomiędzy β-kateniną a α-kateniną jest regulowane przez kinazy i fosfatazy. Kinazy GSK-3β i CK-2 fosforylują koniec NH<sub>2</sub> β-kateniny, co umożliwia jej degradację w cytozolu. Te same kinazy fosforylują w trzech miejscach wewnątrzkomórkową część kadheryny w obrębie SER<sup>684</sup>, SER<sup>686</sup>, SER<sup>692</sup>, zwiększając jej powinowactwo do β-kateniny i stabilizując jednostkę E-kadherynowo-kateninową (ang. *E-Cadherin-Catenin Unit*, ECCU). W ten sposób zmniejsza się także ilość kateniny w cytozolu. Natomiast fosforylacja TYR<sup>142</sup> β-kateniny przez cytoplazmatyczną kinazę Fer powoduje rozpad wiązania pomiędzy β i α kateniną, a TYR<sup>489</sup> i TYR<sup>654</sup> przez kinazę c-Src i kinazę receptora EGF - rozpad wiązania β-kateniny z kadheryną. Aktywacja kinaz tyrozynowych powoduje więc utratę połączeń międzykomórkowych mediowanych przez kadherynę oraz zwiększenie ilości β-kateniny w cytozolu. Fosforylacja tyrozyny w cząsteczce β-kateniny i rozpad ECCU jest



równoważony przez działanie fosfataz TYR wiążących się do  $\beta$ -kateniny i kadheryny. Niereceptorowa fosfataza PTPB1 (ang. *protein tyrosine phosphatase*) wpływa na ECCU poprzez wiązanie do cytoplazmatycznej domeny kadheryny i defosforylację  $\beta$ -kateniny w miejscu TYR<sup>654</sup> co powoduje stabilizację kompleksu kadheryny i połączeń międzykomórkowych. Aktywność PTPB1 jest uzależniona od fosforylacji TYR<sup>152</sup>, białka PTPB1 przez kinazę tyrozyny Fer, która odbywa się z udziałem białka p120. Fer łączy się z białkiem p120, fosforyluje TYR<sup>152</sup> PTPB1 umożliwiając jej łączenie z kadheryną i utrzymywanie  $\beta$ -kateniny w stanie defosforylacji<sup>200</sup>.

Degradacja kadheryny jest związana z białkiem Hakai, które jest ligazą ubikwitynową E3. Proces degradacji rozpoczyna się od fosforylacji TYR w cząsteczce E-kadheryny, rozpoznania i połączenia z białkiem *Hakai* i ubikwitynacji. Ekspresja białka *Hakai* w komórkach nabłonkowych prowadzi do rozerwania połączeń międzykomórkowych, zwiększenia endocytozy kadheryny i wzrostu mobilności komórki<sup>200</sup>.

### 10.2. Typy połączeń międzykomórkowych w wątrobie

Boczne powierzchnie hepatocytów są regularne i oddzielone ok. 10 nm przestrzenią międzykomórkową. Nie kontaktują się z naczyniem zatokowym czy kanalikiem żółciowym. Pozbawione są mikrokosmków i posiadają liczne połączenia międzykomórkowe typu desmosomu, obwódki przylegania (*zonula adherens*), obwódki zamykającej (*zonula occludens*, ang. *tight junction*) oraz połączeń typu *nexus* (ang. *gap junction*)<sup>201</sup>. Trzy ostatnie typy połączeń tworzą kompleksy połączeń międzykomórkowych. Połączenia typu obwódki zamykającej leżą w pobliżu kanalików żółciowych włosowatych i izolują kanalikowy kompartment od przestrzeni międzykomórkowej i zatok wątrobowych.

$\beta$ -katenina wraz z pozostałymi kateninami ( $\alpha$  i  $\gamma$ ) bierze udział wraz z E-kadheryną w formowaniu obwódek (płytek) przylegania. Białko to lokalizuje się głównie po wewnętrznej stronie błony komórkowej i zapewnia połączenie E-kadheryny z cytoszkieletem komórki. W rozwoju wątroby komórkową ekspresję  $\beta$ -kateniny oprócz błon komórkowych, obserwowano w cytoplazmie i jądrach komórkowych hepatocytów. W dojrzałej wątrobie  $\beta$ -katenina wykazuje wyłącznie błonową ekspresję<sup>175</sup>.

### 10.3. Kompleks kadheryna/katenina i przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (EMT)

Kompleks kadheryna/katenina aktywnie uczestniczy w przemianach: nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) oraz mezenchymalno-nabłonkowej (MET), które odgrywają szczególną rolę w rozwoju embrionalnym, włóknieniu tkankowym i progresji nowotworów<sup>193</sup>. Proces EMT charakteryzuje się przechodzeniem zróżnicowanych komórek nabłonkowych w fibroblasty lub miofibroblasty, produkujące składniki macierzy pozakomórkowej. Komórki nabłonka tracą swoje markerowe białka takie jak E-kadheryna, białko ZO-1 (ang. *zonula occludens-1*) i cytokeratyny, uzyskując fenotypowe markery komórek mezenchymalnych, takie jak m.in. wimentyna, aktyna komórek mięśniowych gładkich  $\alpha$  (ang.  *$\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA*) czy specyficzne dla fibroblastów białko-1 (ang. *fibroblast-specific protein-1, FSP1*). Ponadto komórki o zmienionym fenotypie zaczynają produkować komponenty macierzy pozakomórkowej, głównie kolagen typu I i fibronektynę<sup>193</sup>. Konsekwencje EMT są łatwe do wyobrażenia i polegają przede wszystkim na szybkiej utracie połączeń komórka-komórka. Utrata E-kadheryny prowadzi do „uwolnienia”  $\beta$ -kateniny i ułatwia EMT, a pojawienie się i ekspresja E-kadheryny przywraca zmieniony fenotyp komórki. Poprzez dynamiczny recykling kadheryny, wspomniane wcześniej białko *Hakai* może modulować adhezję komórkową i brać udział w EMT istotnej w powstawaniu przerzutów nowotworowych<sup>202</sup>. Połączenia międzykomórkowe mediowane przez kadherynę są także punktem uchwytu dla metaloproteinazy ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*), która ma zewnątrzkomórkową domenę kadheryny tuż przy jej części przezbłonowej, jednocześnie uwalnia  $\beta$ -kateninę i zwiększa jej aktywność transkrypcyjną, ekspresję genu cykliny D1 i proliferację komórkową<sup>203</sup>. Także wewnątrzkomórkowa domena kadheryny może być celem proteolitycznego cięcia przez białko *Presenilin*, powodując utratę adhezji komórkowej i wzrost ilości wolnej  $\beta$  i  $\alpha$ -kateniny<sup>204</sup>. Regulacja transkrypcji genów kadheryny jest związana z metylacją genu promotorowego. Hypermetylacja genu promotorowego prowadzi do zmniejszenia ekspresji kadheryny, progresji choroby i tworzenia przerzutów nowotworowych<sup>205</sup>. Białka regulatorowe zawierające struktury palców cynkowych kodowane przez rodzinę genów *Snail* i *Slug* oraz białko SIP1 (ang. *Smad Interacting Protein*) są ujemnymi regulatorami E-kadheryny, poprzez hamowanie transkrypcji jej genu. Aktywacja genu *Slug* jest powiązana z aktywacją kanonicznej ścieżki  $\beta$ -kateniny, gdyż podlega kontroli TCF/LEF<sup>206</sup>.

$\beta$ -katenina odgrywa również rolę w procesie EMT zależnym od TGF- $\beta$  i kompleksów połączeń międzykomórkowych<sup>207</sup>. W nieobecności TGF- $\beta$ , zarówno E-kadheryna, jak i  $\beta$ -katenina są degradowane, co wiąże się z utratą kontaktów komórka-komórka. Jednocześnie zwiększona jest cytoplazmatyczna „dostępność”  $\beta$ -kateniny i możliwy jej transport do jądra komórkowego<sup>208</sup>.

#### 10.4. Kompleks kadheryna/katenina a włóknienie wątroby

W mechanizmie włóknienia narządów, jako końcowej fazy w wielu przewlekłych schorzeniach człowieka, a także jako odzwierciedlenia EMT występują zaburzenia ekspresji kompleksu kadheryna/katenina<sup>209</sup>. Włóknienie narządowe (w wątrobie, płucach, nerkach) ściśle wiąże się z obniżeniem ekspresji E-kadheryny, nadekspresją  $\beta$ -kateniny z jej cytoplazmatyczną translokacją, co skutkuje utratą połączeń międzykomórkowych<sup>193</sup>. Zmiany takie opisano również w komórkach nabłonka żółciowego u pacjentów z pierwotną marskością żółciową (ang. *primary biliary cirrhosis*), pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych (ang. *primary sclerosing cholangitis*) i alkoholowym zapaleniu wątroby<sup>210</sup>.

Szlak Wnt/ $\beta$ -katenina uczestniczy w mechanizmach włóknienia wątroby poprzez wpływ na komórki gwiazdziste wątroby (HSCs). W badaniach na kulturach aktywowanych HSCs, pochodzących od gryzoni stwierdzono 3 do 12-krotne zwiększenie ilości mRNA genów kanonicznej (Wnt-3A i 10B) i niekanonicznej (Wnt-4 i 5a) ścieżki Wnt, receptorów Fzd-1 i 2 oraz koreceptorów LRP-6 i Ryk w porównaniu z normalnymi spoczynkowymi HSCs, oraz znacznie zwiększoną jądrową ekspresję  $\beta$ -kateniny. Aktywność promotora genów zależnych od TCF była stymulowana przez WNT-1 i hamowana przez inhibitory szlaku Wnt- Chibby (blokującego interakcje  $\beta$ -kateniny z TCF) i Dkk-1 (blokującego interakcje Wnt z LRP). Dkk-1 zwiększa aktywność promotora genów receptora aktywowanego przez proliferatory peroksisomów  $\gamma$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR- $\gamma$ ), kluczowego proadipogenicznego elementu transkrypcyjnego. Obecność Dkk-1 zmniejsza<sup>3</sup> a stymulowane<sup>H</sup> przez agonistki aktywację HSCs, a wysoki poziom Dkk-1 zwiększa<sup>3</sup> apoptozę w aktywowanych hodowlach komórek gwiazdzistych. Także w komórkach gryzoni otrzymanych z wątroby z eksperymentalnie wywołanym przez cholestazę włóknieniem, stwierdzano zwiększoną ekspresję genów Wnt i Fzd, oraz łagodzący wpływ Dkk na indukowane włóknienie<sup>211</sup>. W innej pracy stwierdzono aktywację proliferacji HSC oraz hamowanie TRAIL-indukowanej apoptozy pod wpływem Wnt-3A. Stwierdzono także odwrotną zależność, czyli

hamowanie aktywności i wzrost apoptozy w HSCs pod wpływem inhibitora ścieżki Wnt, tj. białka SFRP 1 (ang. *Secreted frizzled-related protein 1*) w HSCs pochodzących z ludzkiej wątroby<sup>212</sup>.

#### 10.5. Zaburzenia ekspresji kompleksu kadheryna/katenina a kancerogeneza

Proces EMT jest ważnym mechanizmem w rozwoju raka, a także początkowych etapów przerzutowania<sup>213</sup>. Rozerwanie połączenia E-kadheryna/ $\beta$ -katenina i nieprawidłowa komórkowa lokalizacja białek tego kompleksu uczestniczy w zmianach morfogenetycznych guza. Zaburzenie ekspresji E-kadheryny w komórkach nowotworowych powiązane jest z wyższym stopniem złośliwości, niższym stopniem zróżnicowania, obecnością przerzutów odległych a także skróceniem czasu przeżycia chorych<sup>214</sup>. Zmiany w ekspresji E-kadheryny mogą być związane z mutacją lub delecją genu CDH1 zlokalizowanego na ramieniu długim chromosomu 16 (16q22.1). Utratę heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*, LOH) genu CDH1 stwierdzano często w rakach żołądka, prostaty, HCC, przełyku i szczególnie często w raku piersi. Hypermetylację genu promotorowego E-kadheryny obserwowano w 49% HCC, a hypermetylację genu APC w 53% HCC, przy czym metylacja APC dotyczyła częściej HCC na tle zakażenia HCV niż pacjentów niezakażonych HCV/HBV<sup>215</sup>. Za hypermetylację genu paromotorowego E-kadheryny może być odpowiedzialna zwiększona aktywność supresorów transkrypcji E-kadheryny, jak *Slug* (rak jajnika i sutka), *Snail* (rak sutka i rozsiany rak żołądka), *Twist* (rak sutka) oraz białek *SIP1/ZEB2* (rak żołądka o typie jelitowym). Wzmocniona endocytoza i procesy proteolityczne mogą również prowadzić do zmniejszenia aktywności tego białka. Zwiększona aktywność kinaz (c-Met, Src) czy EGF-R (ang. *epidermal growth factor receptor*) poprzez fosforylację TYR, powoduje uwolnienie E-kadheryny z kompleksu ECCU i jej degradację. Wzmocnioną aktywność metaloproteinazy ADAM-15 poprzez cięcie zewnątrzkomórkowej części E-kadheryny, opisano w raku piersi i prostaty. Rozpuszczalne odcięte domeny zewnętrzne E-kadheryny zaburzają strukturę połączeń międzykomórkowych i stabilizują heterodimeryzację HER-2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*) z HER-3, co prowadzi do aktywacji kinazy ERK i promocji zarówno migracji, jak i proliferacji komórek<sup>216</sup>.

Ważnym zjawiskiem w morfogenezie i onkogenezie jest zmiana ekspresji kadheryn z poszczególnych podtypów, tzw. przełączanie kadheryn (ang. *cadherin switching*). Najbardziej

znany jest zmniejszenie ekspresji E-kadheryny a wzrost N-kadheryny i zmiana właściwości komórki z adhezyjnych na migracyjne. Zmiana ta jest częścią programu EMT. W rozwoju zarodkowym ma ona miejsce podczas gastrulacji czy tworzeniu grzebieni nerwowych z neuroektodermy, co umożliwia uwolnienie komórek ze zwartych struktur nabłonkowych i ich migrację. Jest to niezbędny mechanizm bez którego mezenchymalne komórki nigdy by nie powstały<sup>217</sup>. Mechanizm ten został opisany także w onkogenezie raka sutka<sup>218</sup> i jelita grubego<sup>219</sup>. Proces ten prowadził do zwiększenia inwazyjności, ruchliwości komórek oraz tworzenia przerzutów odległych. Inwazyjność i zdolność do przemieszczania się komórek podlegających przemianie EMT, związana jest bardziej z obecnością nienabłonkowej N-kadheryny niż ze zmniejszeniem ekspresji E-kadheryny, co może być wynikiem łączenia N-kadheryny z FGF-R i aktywacji szlaku MAPK/ERK<sup>220,203</sup>. Co więcej uważa się, że N-kadheryna wpływa na aktywację ścieżki Akt/PKB, stabilizację  $\beta$ -kateniny i inaktywację proapoptotycznego białka Bad, co zostało opisane w przypadku czerniaka<sup>221</sup>.

W ostatnich latach bierze się pod uwagę również stężenie rozpuszczalnej formy E-kadheryny (ang. *soluble E-cadherin*) jako markera kancerogenezy w HCC<sup>222</sup>. Pacjenci z wyjściowo wyższym stężeniem tej formy białka mieli wcześniejsze nawroty choroby. W niektórych badaniach stężenie rozpuszczalnej formy E-kadheryny nie różniło się znamiennej pomiędzy pacjentami z HCC i marskością wątroby, sugerując, że rozpuszczalna forma E-kadheryny nie może służyć do wczesnego wykrywania HCC<sup>187</sup>. Ta postać E-kadheryny uważana jest bardziej za czynnik prognostyczny niż diagnostyczny w HCC<sup>222</sup>.

## ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Zakażenie HCV w 60-80% prowadzi do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby, w 40% do zaawansowanej marskości wątroby, w 60% przypadków do rozwoju pierwotnego raka wątroby. Mechanizmy kancerogenezy wątrobowej są wciąż niejasne.

W warunkach fizjologicznych  $\beta$ -katenina odgrywa istotną rolę podczas rozwoju embrionalnego wątroby oraz w regeneracji tego narządu. W błonie komórkowej hepatocytów (głównie biegun żółciowy)  $\beta$ -katenina w kompleksie z E-kadheryną tworzy adhezyjne połączenia międzykomórkowe.

W patologii natomiast  $\beta$ -katenina jest centralnym białkiem tzw. ścieżki kanonicznej szlaku Wnt/Fzd/ $\beta$ -katenina i może spełniać rolę onkogenu. Związki pomiędzy zaburzeniami ekspresji genowej tego białka a nasilaniem proliferacji komórkowej dotyczą głównie HCC o różnej etiologii oraz *hepatoblastoma*. Nasilanie transkrypcyjnej aktywności  $\beta$ -kateniny wiąże się również z mutacjami genu CTNNB1, które częściej występują w HCC na tle przewlekłego zakażenia HCV. Ostatnio podkreślana jest rola białek HCV (NS5A, białko C) w indukowaniu szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w hodowlach komórkowych. Nieliczne są wyniki badań na temat roli ekspresji genowej  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w przewlekłym zakażeniu HCV *in vivo*.

Celami pracy były:

1. Ocena komórkowej ekspresji białek adhezyjnych:  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C) i raku wątrobowokomórkowym (HCC) w odniesieniu do wybranych markerów proliferacji komórkowej, zmian histologicznych i danych klinicznych.
2. Ocena komórkowej ekspresji N-kadheryny i wimentyny jako wybranych wskaźników przemiany nabłonkowo-mezenchymatycznej (EMT) w wątrobie pacjentów z pzw C i HCC.
3. Określenie roli tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E- i N-kadheryny w progresji przewlekłego zapalenia wątroby typu C.

## **MATERIAŁ I METODY**

### **PACJENCI**

#### **Grupa badana**

Grupę badaną stanowiło 63 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby (pzw C) i/lub marskością tego narządu na tle przewlekłego zakażenia wirusem C zapalenia wątroby diagnozowanych i leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (ul. Szwajcarska 3, Poznań) w latach 2007-2010.

Podstawowe dane demograficzne, wyniki badań laboratoryjnych i histopatologicznych przedstawia **Tabela 2A** (Aneks).

Dane z wywiadu dotyczyły prawdopodobnej drogi zakażenia wirusem HCV. Najczęściej były to: transfuzje krwi, zabiegi operacyjne i pobyty szpitalne, drobne zabiegi z naruszeniem ciągłości skóry lub błon śluzowych, krwiodawstwo, kolczykowanie różnych okolic ciała oraz wykonywanie tatuaży i pobieranie narkotyków dożylnych. U wielu chorych czynników ryzyka nabycia zakażenia HCV było kilka i trudno było jednoznacznie określić czas trwania zakażenia HCV w tych przypadkach. W badaniu podmiotowym zwracano także uwagę na współistniejące choroby lub zakażenia. Nie było pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek ani czynną chorobą nowotworową. Wśród pacjentów żaden nie chorował na cukrzycę. Nie było osób nadużywających spożycie alkoholu. Żaden z pacjentów włączonych do badania nie był uprzednio leczony przeciwwirusowo zarówno monoterapią (interferon alfa) jak i terapią skojarzoną (interferon/pegylowany interferon i rybawiryna).

U wszystkich pacjentów z grupy badanej, biopsję wątroby przeprowadzano w ramach kwalifikacji do leczenia przeciwwirusowego.

#### **Grupa z rakiem pierwotnym wątroby (HCC)**

Grupę z HCC (n=61) stanowiły archiwalne bloczki parafinowe z zatopionym materiałem tkankowym guza wątroby z potwierdzonym klinicznie i badaniem histopatologicznym pierwotnym rakiem wątroby (HCC) (n=4, wiek 67-72 lata). Tylko u jednego z tych badanych pacjentów potwierdzono zakażenie HCV. Bloczki parafinowe uzyskano z Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu (u. Garbary 15, Poznań).

Pozostałą część kontroli stanowił komercyjnie dostępny tkankowy panel z HCC potwierdzonym immunocytochemicznie przez producenta (antygen proliferacyjny PCNA)

(Tissue Microarray Panel, Cybrdi Inc., Maryland, USA) (n=57). W tych przypadkach status serologiczny czy wirusologiczny dotyczący zakażenia HCV był nieznanym.

Wiek i płeć oraz stopień złośliwości histologicznej (*Grade*) HCC pacjentów z grupy z HCC przedstawiono w **Tabeli 2B** (Aneks). Większość pacjentów (68%) demonstrowała II stopień złośliwości histologicznej guza.

#### **Grupa kontrolna (n=8)**

Kontrolę stanowił materiał tkankowy archiwalny pochodzący z wątrób przeznaczonych do przeszczepu narządu (pobrane okołoperacyjnie, bez morfologicznych cech patologii) (n=1, wiek 60 lat), z morfologicznie prawidłowej wątroby wokół wycinanej zmiany ogniskowej w wątrobie (n=4, wiek 20-72 lata), biopsji wątroby u osoby HCV-negatywnej (diagnostyka podwyższonej aktywności aminotransferaz bez zdiagnozowanej przyczyny) (n=1, wiek 35 lat), kontroli negatywnej obecnej w tkankowym panelu z HCC (Tissue Microarray Panel, Cybrdi Inc., Maryland, USA) (n=2, wiek 55 i 66 lat). Materiał tkankowy archiwalny uzyskano z Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Chirurgii Onkologii Gastroenterologicznej i Chirurgii Plastycznej UM w Poznaniu (ul. Przybyszewskiego 49, Poznań).

Wiek i płeć pacjentów z kontroli negatywnej przedstawiono w **Tabeli 2C** (Aneks).

#### **Badania biochemiczne**

Uzyskane do pracy wyniki badań biochemicznych w grupie badanej (pzw C), takie jak: aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), gammaglutamylotranspeptydazy (GGTP), stężenie całkowitego cholesterolu, stężenie białka całkowitego z elektroforezą, wykonano przy użyciu analizatora MURA 200 firmy POINTE SCIENTIFIC (*Italy*) używając odczynników i kalibratorów tej firmy.

Stężenie alfafetoproteiny (AFP) w surowicy badano metodą chemiluminescencyjną na analizatorze ARCHITECT i 2000 z zastosowaniem testu ARCHITECT AFP (ABBOTT, *Sligo, Ireland*).

#### **Badania potwierdzające zakażenie HCV**

Każdy pacjent miał zbadaną obecność przeciwciał anty-HCV, które wykrywano metodą chemiluminescencyjną z zastosowaniem testu ARCHITECT Anti-HCV (ABBOTT, Wiesbaden, Germany) na analizatorze ARCHITECT i 2000 firmy ABBOTT. Potwierdzenia zakażenia HCV



dokonywano oznaczając także ładunek wirusa, tj. obecność HCV-RNA w surowicy z zastosowaniem techniki PCR. Dla oznaczenia HCV-RNA test GeneProof HEPATITIS C VIRUS HCV (GeneProof a.s., Brno, Czech Republic) z czułością metody 50 IU/ml. U wszystkich chorych oznaczono genotyp wirusa HCV (VERSANT HCV GENOTYPE 2.0 ASSAY, LiPA). Badania molekularne zostały wykonane w Zakładzie Diagnostyki Medycznej w Poznaniu (ul. Dobra 38, Poznań).

## **MATERIAŁ TKANKOWY**

### **Ocena histopatologiczna bioptatu wątroby w grupie z pzw C**

Wszystkim chorym wykonano biopsję wątroby. Pobrany wycinek wątroby do badań histologicznych utrwalano w 10% roztworze zbuforowanej formaliny i przekazywano do Zakładu Patomorfologii Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia. Oceny materiału dokonywano ze skrawków 5µm z bloczka parafinowego. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną oraz srebrzono według standardowych metod.

W obrazach mikroskopowo-światlnych wszystkie bioptaty były reprezentatywne, gdyż zawierały co najmniej 6 przestrzeni bramnożółciowych.

Do oceny aktywności zapalnej i stopnia zaawansowania włóknienia użyto powszechnie stosowanej skali punktowej według METAVIR<sup>48</sup>. Skala ta oparta jest o literowy (G, S) i cyfrowy (0-3) system punktowy. Oceniana jest aktywność zapalna (*grading, G*) jako: G0 – brak (nieobecność) widocznej aktywności zapalnej, G1 – łagodna aktywność, G2 – umiarkowana aktywność, G3 – ciężka aktywność zapalna. Drugim ocenianym parametrem jest włóknienie (*staging, S*) jako: S0 – brak włóknienia, S1 – włóknienie wrotne bez przegród łącznotkankowych, S2 – włóknienie wrotne z nielicznymi przegradami łącznotkankowymi, S3 – liczne przegrody łącznotkankowe bez marskości, S4 – marskość wątroby<sup>48</sup>.

Do oceny stłuszczenia wątroby brano pod uwagę odsetek hepatocytów z widocznym zwyrodnieniem tłuszczowym (drobno- i/lub wielokropelkowym). Badano co najmniej 5 pól widzenia z każdego bioptatu wątroby i wartość końcową stanowi średnia z tych 5 pól widzenia pod powiększeniem obiektywu mikroskopu x20.

## **Badania mikroskopowe**

Materiał tkankowy (bioptaty wątroby z grupy badanej, fragmenty wątroby z HCC i negatywna kontrola tkankowa) został utrwalony w roztworze zbuforowanej 10% formaliny, następnie zatopiony w parafinie i skrojony na skrawki o grubości 5µm, umieszczone na szkiełkach podstawowych SuperFrost/Plus.

Panel tkankowy z fragmentami HCC od indywidualnych pacjentów również zawierał utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie skrawki tkankowe guzów wątroby i zdrowej wątroby (kontrola) o średnicy 1,5 mm, umieszczone na szkiełku z przeznaczeniem do badań immunocytochemicznych. Dysponowano również dołączonym do zestawu preparatem w rutynowym barwieniu hematoksyliną i eozyną.

## ***Technika immunocytochemiczna (immunohistochemiczna) (IHC)***

Badania immunocytochemiczne przeprowadzono w oparciu o nowy system detekcyjny w immunohistochemii tzw. *new polimer-based IHC*<sup>223</sup>.

Reakcję immunocytochemiczną poprzedziło odparafinowanie i nawodnienie preparatów, przeprowadzając je przez szereg roztworów alkoholu etylowego o malejącym stężeniu, według następującego protokołu:

- ksylen (2x10 min)
- 100% alkohol etylowy (2x 10 min)
- 90% alkohol etylowy (5 min)
- 85% alkohol etylowy (5 min)
- 80% alkohol etylowy (5 min)
- 70% alkohol etylowy (5 min)

Następne etapy reakcji IHC były następujące:

2. Płukanie w wodzie bieżącej (10 min)
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w wodzie destylowanej (30 min)
4. Płukanie w wodzie bieżącej (10 min)
5. Płukanie w wodzie destylowanej (10 min)
6. Inkubacja w normalnej surowicy koziej (1:20, Dako) (30 min)

7. Inkubacja ze swoistymi przeciwciałami – 18 godz./ 4°C, a następnie przez jedną godzinę w temp. pokojowej
8. Płukanie w roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS) (3x3 min)
9. Inkubacja w roztworze zawierającym polimer („szkielet” dekstranowy) skoniugowany z wieloma cząsteczkami peroksydazy (ang. *horse radish peroxidase*, HRP) i wtórne przeciwciała kozie przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim (Dako REAL™ EnVision/HRP, Rabbit/Mouse, Dako) (20 min)
10. Płukanie w PBS-ie (3x3min)
11. Inkubacja z 3-3’ diaminobenzydyną (DAB) (Dako REAL DAB, Dako) (5-7 min)
12. Płukanie w wodzie bieżącej (10 min)
13. Płukanie w wodzie destylowanej (10 min)
14. Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 80%, 85%, 90%, 2x100%) i w ksylenie
15. Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu (Marienfeld) i szkiełek nakrywkowych

W badaniach immunocytochemicznych wykorzystano swoiste monoklonalne przeciwciała (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w badaniach immunohistochemicznych.

<b>Przeciwciało</b>	<b>Wykrywany antygen/immunogen</b>	<b>Typ przeciwciała, rozcieńczenie, producent</b>
Anty-beta-katenina	Pochodna <i>E. coli</i> , rekombinowana ludzka beta-katenina ( <i>rhbeta-Catenin</i> ); aa 2-781 (całkowita forma białka $\beta$ -kateniny)	Monoklonalne, mysie antyludzkie, 1:50, R@DSystems, UK; klon <i>196618</i>
Anty-E-kadheryna	E-kadheryna ( <i>uvomorulin</i> ) i rekombinowane białko GST	Monoklonalne, mysie antyludzkie, 1:100, DakoCytomation; klon <i>NCH-38</i>
Anty-N-kadheryna	Prokariotyczne rekombinowane białko odpowiadające 160 aa C-końcowego fragmentu cząsteczki ludzkiej N-kadheryny	Monoklonalne, mysie antyludzkie, 1:50, Novocastra Labs Ltd, Newcastle upon Tyne, UK; clone: IAR06
Anty-Ki-67	Ludzkie rekombinowane białko odpowiadające fragmentowi 1002 bp Ki-67 cDNA	MIB-1, 1:2, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA
Anty-cyklina D1	Rekombinowana ludzka cyklina D1 o pełnej długości; rozpoznawany epitop zlokalizowany jest pomiędzy aa 151-165 w centralnej domenie białka	Monoklonalne mysie antyludzkie, gotowe do użycia, klon <i>DCS-6</i> ; DakoCytomation
Anty-wimentyna	Wimentyna izolowana z bydłych soczewek ocznych	Monoklonalne mysie antyludzkie, 1:200, klon <i>Vim 3B4</i> ; Dako Glostrup, Denmark A/S

Większość preparatów podbarwiano hematoksyliną (2 min), następnie płukano w wodzie bieżącej i destylowanej (po 10 min), jako etap poprzedzający odwodnienie preparatów.

Wszystkie preparaty były wykonywane techniką IHC w tych samych warunkach oraz z zastosowaniem tych samych rozcieńczeń przeciwciał, co umożliwiło porównanie intensywności barwienia między poszczególnymi pacjentami.

Przeprowadzano również wewnętrzne kontrole negatywne, zastępując specyficzne przeciwciała przez surowice odpowiedniego gatunku w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% albumin bydlęcych (BSA) i 15mM azydku sodu.

Wszystkie przeciwciała swoiste wymagały dodatkowego odślaniania determinant antygenowych za pomocą wysokiej temperatury. Procedura polegała na zastosowaniu po etapach odparafinowania i nawodnienia dodatkowego etapu gotowania preparatów w 10mM buforze cytrynianowym w kuchence mikrofalowej o mocy 700W przez 15 minut. Następnie preparaty płukano w PBS-ie i od punktu 3 prowadzono reakcję według powyżej opisanej standardowej procedury.

### ***Technika ImmunoMax***

W przypadku wykrywania ekspresji  $\beta$ -kateniny zastosowano technikę *ImmunoMax*. W tym celu do amplifikacji barwnego produktu reakcji immunocytochemicznej stosowano biotynylowaną tyraminę (*PerkinElmer Life Sciences, Inc. MA, USA*). Reakcję przeprowadzono według etapów opisanej powyżej techniki IHC do punktu 9, a następnie:

10. Płukanie w roztworze PBS/Tween – 3x3 min.
11. Inkubacja z biotynylowaną tyraminą (1:50) – 10 min.
12. Inkubacja w roztworze Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse – 20 min.
13. Płukanie w PBS-ie – 3x3min.
14. Inkubacja z 3-3'diaminobenzzydynam (DAB, Dako) – 5-7 min.
15. Płukanie w wodzie destylowanej – 5 min.
16. Odwodnienie w alkoholach o wzrastającym stężeniu (2x95%, 2x100%) i w ksylenie (2x)
17. Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu i szkiełek nakrywkowych

Badania zastosowaniem techniki IHC oraz ImmunoMax dla każdego antygeny przeprowadzono dwukrotnie na preparatach pozyskanych od wszystkich pacjentów. Skrawki te następnie analizowano w mikroskopie świetlnym Olympus BH-2.

### ***Technika hybrydyzacji in situ***

Na podstawie danych z piśmiennictwa<sup>162</sup>, do wykrywania mRNA  $\beta$ -kateniny wykorzystano jednoniciowe sondy oligonukleotydowe (DNA) znakowane na końcu 5' digoksygeniną, o następującej sekwencji:

1. 5' –Dig-ATG GAA CCA GAC AGA AAA G-3'
2. 5'-Dig-TAC AGG ACT TGG GAG GTA TC-3'

Sondy zostały otrzymane na drodze syntezy chemicznej w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonuleotydów IBB PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa.

Do techniki hybrydyzacji in situ wszystkie stosowane roztwory przygotowano na bazie wody z 1% DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*). Procedurę wykonano według następujących etapów:

1. Odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylie (2 x 5 min), alkoholach o malejącym stężeniu (2x100%, 2x95% po 5 min) i wodzie DEPC (5 min)
2. Płukanie w roztworze 0,05M TRIS – 5 min
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w wodzie DEPC – 15 min
4. Trawienie proteinazą K (200µg/ml, Dako) – 10 min/37°C
5. Płukanie w PBS-ie – 5 min
6. Utrwalenie w 4% paraformaldehydzie w PBS-ie – 20 min/4°C
7. Płukanie w wodzie DEPC – 5 min
8. Pre-hybrydyzacja: inkubacja w mieszaninie hybrydyzacyjnej: 2xSSC (Sigma-Aldrich) + 30% formamid + woda DEPC – 2h/37°C
9. Inkubacja z sondą oligonukleotydową rozpuszczoną w mieszaninie hybrydyzacyjnej – 16-18h/37°C, w stężeniu 1:1000 ng/ml
10. Odpłukanie nadmiaru niezwiązanych sond w roztworach: 4xSSC/30% formamid/woda DEPC i 2xSSC/30% formamid/woda DEPC – cztery razy po 5 min/37°C

11. Płukanie w roztworze 0,1% Triton X-100 w TBS – 15 min
12. Inkubacja z przeciwciałem anti-digoksygeninowym znakowanym peroksydazą (Roche Diagnostics) w rozcieńczeniu 1:50 – 1h/temp. pokojowa
13. Płukanie w PBS-ie – 3x3min
14. Inkubacja z 3-3'diaminobenzzydynam (DAB, Dako) – 5-7 min
15. Płukanie w wodzie bieżącej – 5 min
16. Płukanie w wodzie destylowanej – 5 min
17. Odwodnienie w alkoholach o wzrastającym stężeniu (2x95%, 2x100%) i w ksylenie (2x)
18. Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu i szkiełek nakrywkowych

Przeprowadzano również negatywne reakcje kontrolne, inkubując preparaty w mieszaninie hybrydyzacyjnej bez dodatku sondy molekularnej.

Do badania ekspresji transkryptu  $\beta$ -kateniny wybrano preparaty histologiczne z potwierdzoną wcześniej w metodzie immunocytochemicznej, obecnością lub znaczącą ekspresją tego białka w grupie pzw C (n=13), HCC (n=4) oraz kontroli (n=3). Zastosowanie tej uzupełniającej metody badań miało na celu przede wszystkim potwierdzenie lub wykluczenie produkcji transkryptu w komórkach wątroby z przewlekłym zakażeniem HCV, HCC i w kontroli. Ekspresja mRNA  $\beta$ -kateniny nie podlegała ocenie ilościowej.

Badania z zastosowaniem techniki hybrydyzacji *in situ* na wykrywanie mRNA  $\beta$ -kateniny przeprowadzono dwukrotnie na preparatach pozyskanych od pacjentów zakwalifikowanych do tych badań. Skrawki te następnie analizowano w mikroskopie świetlnym Olympus BH-2.

Badania immuno- i hybrydocytochemiczne przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

### **Półilościowa ocena ekspresji białek**

Dotyczyła badania ekspresji immunocytochemicznej antygenu proliferacyjnego Ki-67, cykliny D1 oraz wimentyny. Zastosowano 4-punktową skalę półilościową wg Gatter i wsp.<sup>224</sup>, która przedstawia się następująco:

- **1:** 0-10% komórek z pozytywną reakcją
- **2:** 11-25% komórek z pozytywną reakcją

- **3:** 26 do 50% komórek z pozytywną reakcją
- **4:** 51-75% komórek z pozytywną reakcją

W przypadku ekspresji antygenu Ki-67 i cykliny D1 oceniano wyłącznie liczbę immunopozytywnych jąder komórkowych, a w przypadku ekspresji wimentyny cytoplazmatyczną i/lub jądrową ekspresję białka. Reakcję IHC dla tych białek oceniano w dziesięciu polach widzenia mikroskopu świetlnego (Olympus BH-2) w powiększeniu obiektywu 40x. Jako końcowy wynik brano pod uwagę średnią wartość ekspresji z 10 pól widzenia.

### **Archiwizacja komputerowa obrazów z immunocytochemiczną ekspresją białek**

Preparaty mikroskopowe oceniano przy pomocy mikroskopu optycznego Olympus BH-2 z zastosowaniem wbudowanej kamery cyfrowej i połączonej z komputerem. Najpierw rejestrowano i archiwizowano kolorowe obrazy mikroskopowe w powiększeniu obiektywu 40x (co najmniej 10 pól z każdego preparatu histologicznego danego pacjenta) o wielkości 2560x1920 pikseli przy użyciu programu komputerowego LUCIA Image 5.0, zapisując je w formacie jpg. na dysku twardym komputera.

Archiwizacja komputerowa obrazów mikroskopowych dotyczyła wszystkich badanych białek adhezyjnych tj.  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny oraz antygenu proliferacyjnego Ki-67, cykliny D1 oraz wimentyny.

W przypadku negatywnej reakcji immunohistochemicznej na dane białko, nie wykonywano dokumentacji fotograficznej, a w analizie statystycznej ujmowano wartości zerowe w takich przypadkach.

Badania immunocytochemiczne oraz archiwizację obrazów mikroskopowych przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Maciej Zabel).

### **Analiza ilościowa reakcji immunocytochemicznej z zastosowaniem metody morfometrycznej**

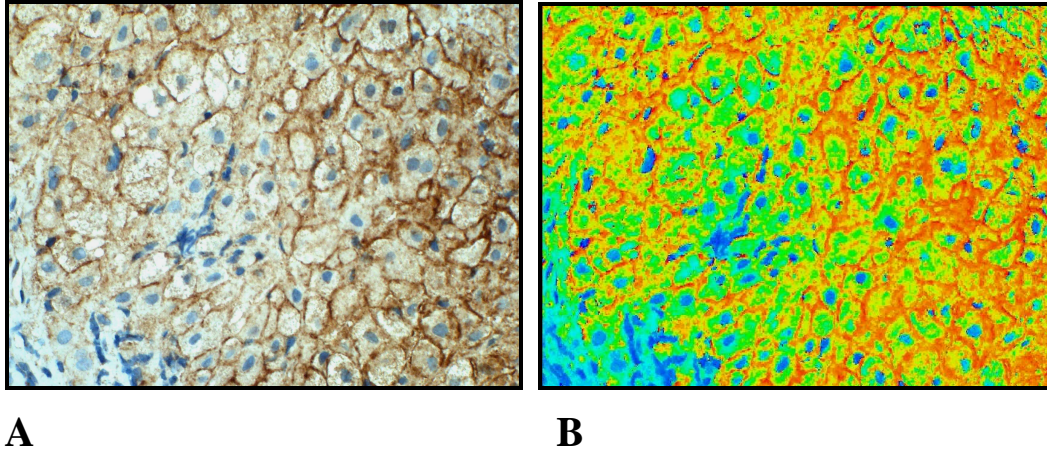
Do analizy ilościowej z zastosowaniem *Programu Filtr HSV*<sup>225</sup> ostatecznie zakwalifikowano ponad 2000 obrazów z pozytywną reakcją immunocytochemiczną. Wśród tych obrazów mikroskopowych, ok. 1200 obejmowało obszar miąższu wątroby z reakcją IHC na  $\beta$ -kateninę,



760 obrazów dotyczyło reakcji IHC na wykrywanie E-kadheryny oraz 160 obrazów z pozytywną reakcją IHC na obecność tkankowej ekspresji N-kadheryny w poszczególnych grupach pacjentów.

Analiza morfometryczna została wykonana dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek)

Obrazy z pozytywną reakcją IHC o wielkości 2560x1920 pikseli wykonane oryginalnie w programie LUCIA Image 5.0 połączonym z mikroskopem Olympus BH-2, poddano analizie morfometrycznej w programie Filtr HSV. Program pozwala na przeprowadzenie analizy powierzchni reakcji, jak również na zliczenie obiektów, w obrębie których stwierdzono występowanie określonej reakcji. Analiza może zostać dokonana w sposób półautomatyczny, jak również automatyczny, bez konieczności interakcji ze strony użytkownika. Tryb półautomatyczny różni się od trybu automatycznego tym, że każdy krok analizy przeprowadzany jest pod kontrolą badacza. Program ten korzysta z algorytmu opierającego się na segmentacji metodą progowania w przestrzeni barwnej HSV, w której to każdy kolor opisywany jest za pomocą trzech składowych: odcień (ang. *Hue*) – barwa światła, nasycenie barwy (ang. *Saturation*), jasność danej barwy (ang. *Value*). Stosowany w programie algorytm wyznacza dla każdego ocenianego obrazu zakres wartości składowych H, S, V charakterystyczny dla dodatniej reakcji immunohistochemicznej. Następnym etapem jest kwantyfikacja obszarów dodatniej reakcji w oparciu o wyznaczone wcześniej kryteria i zliczanie struktur, w obrębie których stwierdza się tę reakcję. Celem zapewnienia możliwie dużej uniwersalności, w programie zaimplementowano także uniwersalny algorytm automatyczny, który można dostosować do innych typów barwień. Na początkowym etapie analizy, w celu usunięcia artefaktów związanych z jakością zdjęcia, zaimplementowano filtr uśredniający z maską o wielkości 3x3 piksele. Następnie metodą półautomatyczną obliczono pole powierzchni reakcji badanych białek adhezyjnych i przeliczono na procent reakcji w stosunku do całego obrazu<sup>225</sup> (**Rycina 5**).



Rycina 5. Okna robocze programu *Filtr HSV*.

Objaśnienia:

**A** – obraz uzyskany w mikroskopie świetlnym połączonym z kamerą cyfrową. Brązowy odczyn barwny na  $\beta$ -kateninę, podbarwienie jąder komórkowych (kolor niebieski) hematoksyliną. Technika ImmunoMax. Powiększenie obiektywu 40x.

**B** – obraz barwny H, uzyskany przed „rzutem” immunocytochemicznej reakcji na płaszczyznę

**C** – projekcja obrazu reakcji immunohistochemicznej na płaszczyznę jako ostateczny wynik do pomiaru jego powierzchni oraz udziału procentowego w polu widzenia (polu powierzchni) miększu wątroby.

Wyniki uzyskane w analizie morfometrycznej eksportowano do formatu programu Microsoft Excel, który jest kompatybilny z programem Statistica PL v. 9, w celu przeprowadzenia analizy statystycznej.

W rozdziale „Wyniki” tej pracy przedstawiono wartości średniej ekspresji immunocytochemicznej danego białka adhezyjnego wyrażone w % reakcji na pole powierzchni mięszu wątroby.

### **Metody statystyczne**

Obliczenia statystyczne wykonano dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek).

W pierwszym etapie analizy statystycznej weryfikowano zgodność wszystkich uzyskanych wyników z rozkładem Gauss'a przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Następnie obliczono parametry statystyki opisowej (średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną). Wyniki porównywano w obrębie trzech grup: badanej (pzw C), z pierwotnym rakiem wątroby (HCC) i kontroli. Dane ekspresji tkankowej (% reakcji na pole powierzchni mięszu wątroby) porównywano z danymi uzyskanymi w HCC lub z kontrolą (zmiennie niepowiązane) z zastosowaniem testu Manna-Whitneya (test nieparametryczny dla zmiennych niepowiązanych dla dwóch grup). W przypadku zmiennych powiązanych zastosowano test Wilcoxon. Zastosowano również test Kruskala-Wallisa i gdy występowały różnice - dodatkowo test wielokrotnych porównań (test Dunn'a). Dla porównania ekspresji antygenu Ki-67, cykliny D1 oraz wimentyny wyrażonych w skali półilościowej zastosowano test Friedmana i kolejno test Dunn'a. Procentowy udział komórkowej lokalizacji (błonowa, cytoplazmatyczna, mieszana) oceniono z zastosowaniem testu różnic między dwoma wskaźnikami struktury. Korelację rang Spearmana zastosowano do skojarzenia wartości zmiennych. Wyniki uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica PL v. 9.

### **Zagadnienia etyczne**

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (nr 182/12) z dnia 2 lutego 2012 roku.

## WYNIKI

### 1. Dane kliniczne grupy badanej (pzw C)

Grupę badaną stanowiło 63 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (pzw C). Podstawowe dane kliniczne, wyniki badań biochemicznych i wirusologicznych tych pacjentów przedstawia **Tabela 2A** (Aneks).

Wiek pacjentów wahał się od 18 do 72 lat (średnia wieku  $37,48 \pm 14,51$  lat). Wśród chorych z pzw C było 30 kobiet i 33 mężczyzn. Średnia wieku kobiet ( $35,23 \pm 14,40$ ) i mężczyzn ( $39,52 \pm 14,52$ ) nie różniła się istotnie ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 3**). Średni czas trwania zakażenia HCV wynosił  $24 \pm 9$  lat i również nie różnił się znamienne w zależności od płci pacjenta z pzw C.

Średnia wartość wskaźnika masy ciała (BMI) mieściła się w granicach normy, choć w grupie zarówno mężczyzn, jak i kobiet stwierdzano nadwagę, a u 3 pacjentów otyłość ( $BMI > 30$ ). Zauważono istotną różnicę w wartości wskaźnika BMI ze względu na płeć (kobiety vs. mężczyźni,  $22,73 \pm 3,36$  vs.  $25,72 \pm 3,80$ ;  $p = 0,004$ ) (**Tabela 3**).

W grupie badanej wykazano podwyższone aktywności aminotransferaz. Średnia aktywność ALT wynosiła około 2-krotność wartości referencyjnych, zaś dla AST zauważono około 1,5-krotny wzrost. Istotną różnicę w aktywności aminotransferaz w zależności od płci zauważono zarówno dla ALT (kobiety vs. mężczyźni odpowiednio  $59,22 \pm 39,80$  i  $101,03 \pm 68,51$  U/l;  $p = 0,003$ ), jak i aktywności AST (kobiety vs. mężczyźni odpowiednio  $48,90 \pm 37,29$  i  $66,72 \pm 38,64$  U/l;  $p = 0,02$ ). Średnia wartość aktywności GGTP ( $52,69 \pm 35,97$  U/l) w grupie badanej była również wyższa niż obowiązujące normy. Znamienne wyższą aktywność GGTP wykazano w grupie mężczyzn ( $63,12 \pm 39,65$  U/l) w porównaniu z kobietami z zakażeniem HCV ( $39,77 \pm 26,34$ ) ( $p = 0,04$ ). Natomiast liczba płytek krwi była istotnie niższa u mężczyzn w porównaniu z kobietami ( $198,72 \pm 68,94$  vs.  $233,52 \pm 67,90$  G/l;  $p = 0,02$ ) (**Tabela 3**).

Średnia wartość stężenia AFP w surowicy w grupie badanej była w granicach normy i wynosiła  $5,97 \pm 9,54$  ng/ml. Najwyższą wartość stężenia AFP w surowicy, tj.  $67,04$  ng/ml zauważono u jednego pacjenta, u którego dokonał się proces marskości wątroby (pacjent nr 48) (**Tabela 2A** – Aneks). Nie było różnic w stężeniu AFP w surowicy pomiędzy kobietami i mężczyznami z pzw C ( $p = 0,550$ ).

Wartości stężenia HCV RNA w surowicy pacjentów z pzw C wahały się od  $9 \times 10^2$  do  $2 \times 10^7$  IU/ml, zaś średnia tego stężenia wynosiła  $10 \times 10^5 \pm 3 \times 10^6$  IU/ml. Podobnie jak w przypadku

stężenia AFP w surowicy, nie notowano różnic płciowych w ładunku wirusa u badanych chorych ( $p=0,227$ ).

Średnie stężenia białka całkowitego, albumin, oraz gamma-globulin oraz cholesterolu były w granicach normy i nie notowano różnic płciowych dla tych parametrów ( $p>0,05$  we wszystkich przypadkach) (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Dane kliniczne oraz wyniki badania histopatologicznego pacjentów z pzw C.

Oceniane zmienne		n	Zakres norm	Średnia	mediana	min	maks.	SD
<i>Wiek (lata)</i>	K	30		35,23	30,00	18,00	63,00	14,40
	M	33		39,52	37,00	19,00	72,00	14,52
	<b>Cała grupa</b>	63		37,48	32,00	18,00	72,00	14,51
<i>Czas trwania zakażenia (lata)</i>	K	18		23,61	24,50	7,00	44,00	9,77
	M	15		24,00	22,00	14,00	44,00	8,83
	<b>Cała grupa</b>	33		23,79	22,00	7,00	44,00	9,21
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i>	K	25	18,5-24,99	22,73	22,42	17,80	29,87	3,36
	M	26		25,72	25,36	19,74	37,61	3,80
	<b>Cała grupa</b>	51		24,25	24,22	17,80	37,61	3,86
<i>ALT (U/l)</i>	K	29	0-38,0	59,22	51,00	18,00	193,60	39,80
	M	32		101,03	85,75	27,60	292,00	68,51
	<b>Cała grupa</b>	61		81,15	63,00	18,00	292,00	60,07
<i>AST (U/l)</i>	K	29	0-35,0	48,90	37,20	15,70	168,00	37,29
	M	32		66,72	56,15	24,00	182,00	38,64
	<b>Cała grupa</b>	61		58,25	42,00	15,70	182,00	38,74
<i>GGTP (U/l)</i>	K	21	8,0-35,0	39,77	29,00	6,00	90,00	26,34
	M	26		63,12	53,50	13,40	140,00	39,65

	<b>Cała grupa</b>			52,69	47,00	6,00	140,00	35,97
<b>AFP (ng/ml)</b>	K	29	0-10,0	5,41	2,95	1,30	38,44	6,97
	M	31		6,49	3,61	1,37	67,04	11,53
	<b>Cała grupa</b>	60		5,97	3,61	1,30	67,04	9,54
<b>HCV RNA (IU/ml)</b>	K	29		389459	44000	941	2510000	695879
	M	31		1525510	120000	1400	21500000	4149305
	<b>Cała grupa</b>	60		976419	88300	941	21500000	3051531
<b>Białko całkowite (g/dl)</b>	K	29	6,2-8,5	7,34	7,40	6,25	8,68	0,62
	M	32		7,12	7,00	6,02	9,60	0,73
	<b>Cała grupa</b>	61		7,22	7,21	6,02	9,60	0,68
<b>Albuminy (g/dl)</b>	K	27	3,4-5,4	3,93	3,94	3,45	4,65	0,29
	M	27		3,80	3,77	2,79	5,66	0,58
	<b>Cała grupa</b>	54		3,87	3,84	2,79	5,66	0,46
<b>Gamma-globuliny (g/dl)</b>	K	29	0,7-1,4	1,49	1,54	0,88	2,26	0,37
	M	32		1,39	1,45	0,84	1,98	0,31
	<b>Cała grupa</b>	61		1,44	1,48	0,84	2,26	0,34
<b>Cholesterol (mg/dl)</b>	K	26	0-200	185,29	190,00	99,00	274,00	41,27
	M	26		169,13	167,50	102,00	251,89	35,72
	<b>Cała grupa</b>	52		177,21	178,65	99,00	274,00	39,08
<b>Grading (G)*</b>	K	30		1,73	2,00	1,00	3,00	0,74
	M	33		1,82	2,00	1,00	3,00	0,77
	<b>Cała grupa</b>	63		1,78	2,00	1,00	3,00	0,75

<i>Staging (S)*</i>	K	30		1,73	1,00	0,00	4,00	1,11
	M	33		1,67	1,00	0,00	4,00	1,05
	<b>Cała grupa</b>	63		1,70	1,00	0,00	4,00	1,07
<i>Stłuszczenie*</i>	K	30		9,47	1,00	0,00	50,00	14,70
	M	33		11,91	5,00	0,00	70,00	18,82
	<b>Cała grupa</b>	63		10,75	3,00	0,00	70,00	16,89

**Objaśnienia:** K - kobiety; M - mężczyźni; SD - odchylenie standardowe; \* - parametry ocenione w skalach półilościowych (patrz Materiał i Metody)

## 2. Ocena nasilenia zmian zapalnych (*grading*), stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*) oraz stłuszczenia wątroby u pacjentów z pzw C

Szczegółową analizę zmian histopatologicznych w bioptatach wątroby u pacjentów z grupy badanej przedstawiono w **Tabeli 4**.

Ocena histopatologiczna wątroby u pacjentów z pzw C u 51 z nich (81%) wykazała minimalną i łagodną aktywność zapalną (*grading* 1 i 2). Nasiloną aktywność zapalną stwierdzono tylko w 19% (12/63) badanych bioptatów wątroby (**Tabela 4**). Nie notowano istotnych różnic w aktywności zapalnej wątroby u chorych z pzw C w zależności od płci pacjenta ( $p=0,697$ ).

Stopień zaawansowania włóknienia (*Staging, S*) w skali numerycznej najczęściej oceniano jako 1. To minimalne włóknienie (S1) dotyczyło 35/63 pacjentów (55%). Łagodne włóknienie (S2) stwierdzono u 13/63 (21%) pacjentów.

Zaawansowane włóknienie wątroby (S3 i S4) obserwowano również u 13/63 pacjentów (21%). Liczba pacjentów z marskością wątroby (*Staging* 4) w przeprowadzonych badaniach wynosiła 7, co stanowi 10% całej grupy badanej.

U dwóch pacjentów z całej badanej grupy nie stwierdzono widocznych morfologicznie wykładników włóknienia w wątrobie (S0) (pacjent nr 11 i 57) (**Tabela 2A - Aneks**).

**Tabela 4.** Liczba pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV demonstrująca określony stopień nasilenia zmian zapalnych (*grading*), zaawansowania włóknienia (*staging*) oraz stłuszczenia wątroby.

<i>Grading</i>					
$\Sigma$ pacjentów	0	1	2	3	
63	0	26	25	12	
<i>Staging</i>					
$\Sigma$ pacjentów	0	1	2	3	4
63	2	35	13	6	7
<i>Stłuszczenie</i>					
$\Sigma$ pacjentów	0	1 (<30% komórek)	2 ( $\geq$ 30% komórek)		
63	29	24	10		

**Objaśnienia:**  $\Sigma$  - suma pacjentów; *grading* (0-3 pkt), *staging* (0-4 pkt) oraz stłuszczenie wątroby (0-2 pkt) oceniono w półilościowych skalach numerycznych (patrz *Materiał i Metody*)

Nie notowano znamienych różnic w stopniu zaawansowania włóknienia w wątrobie pomiędzy kobietami i mężczyznami z pzw C ( $p=0,822$ ).

Nasilone stłuszczenie hepatocytów w biopsjach wątroby u pacjentów z pzw C zebranych w obecnej pracy nie było częstym zjawiskiem. Ewidentne cechy stłuszczenia komórek wątrobowych obserwowano tylko u około połowy chorych (34/63), przy czym średnie stłuszczenie wątroby było w granicach  $11\pm 17\%$  komórek, tj. poniżej 30% hepatocytów (**Tabela 2A**, **Aneks i Tabela 4**). Jedna osoba (pacjent nr 27) demonstrował bardzo nasilone stłuszczenie wątroby (70% hepatocytów) (**Tabela 2A** - **Aneks**). Nie odnotowano istotnych różnic płciowych w stopniu stłuszczenia wątroby w badanej grupie ( $p=0,560$ ).



### **3. Immunocytochemiczna analiza ekspresji białek adhezyjnych**

#### **3.1. $\beta$ -katenina**

Immunocytochemiczną ekspresję  $\beta$ -kateniny w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV oceniono morfometrycznie u 54 pacjentów. Kontrolę stanowiło 8 fragmentów wątroby bez zmian patologicznych. Grupę porównawczą stanowiło 61 raków wątrobowokomórkowych (HCC).

U pacjentów z pzw C komórkową ekspresję  $\beta$ -kateniny wykazano u wszystkich, z wyjątkiem dwóch chorych (96% częstość występowania) (**Rycina 5**). Przeważał homogenny wzór ekspresji tego białka. Komórkowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny dotyczyła zarówno błon komórkowych (31% chorych), jak i cytoplazmy hepatocytów oraz cholangiocyty (44% pacjentów) (**Tablica 1A-H**). Mieszaną błonowo-cytoplazmatyczną lokalizację obserwowano w 13 biopatach wątroby (25%) (**Rycina 6**). Intensywność reakcji oraz odsetek komórek immunopozytywnych w miąższu wątroby były zróżnicowane w zależności od pacjenta z zakażeniem HCV. Pozytywna reakcja dotyczyła również hepatocytów z cechami stłuszczenia (**Tablica 1G**). Nie obserwowano reakcji jądrowej na to białko.

Rozkład odsetka pacjentów z pzw C w zależności od komórkowej lokalizacji  $\beta$ -kateniny w analizie immunocytochemicznej w badanych grupach chorych (pzw C i HCC) oraz kontroli przedstawiono schematycznie na **Rycinie 6**.

W materiale tkankowym HCC pozytywną reakcję IHC na  $\beta$ -kateninę wykazano u 56/61 (92%) badanych guzów wątroby i nie było istotnych różnic w częstości występowania (wykrywania) tego białka pomiędzy tą grupą pacjentów a pzw C i kontrolą ( $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach) (**Rycina 5**).

## Tablica 1.

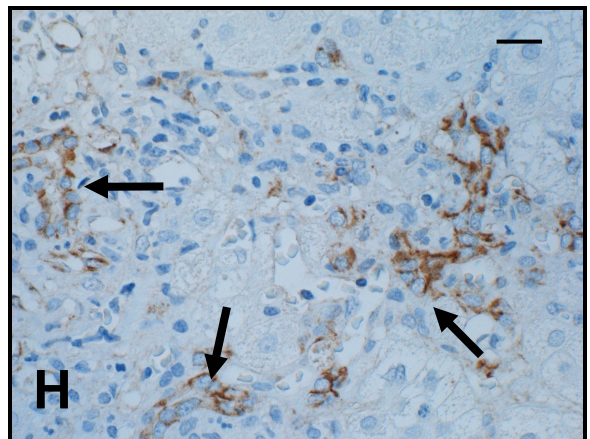
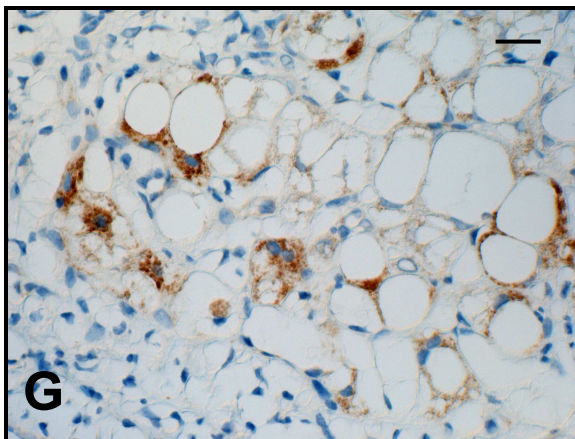
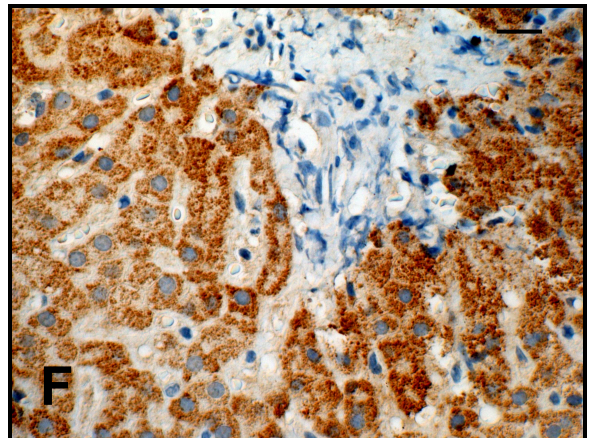
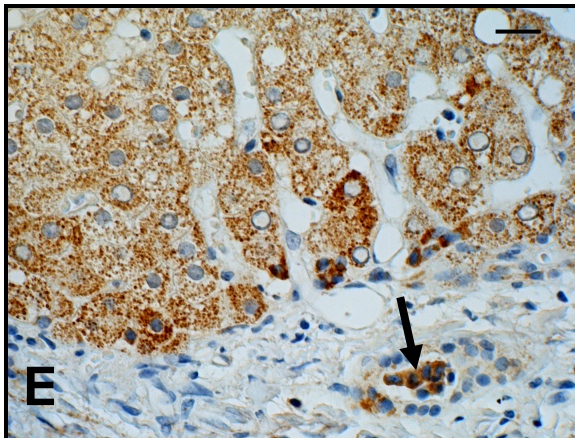
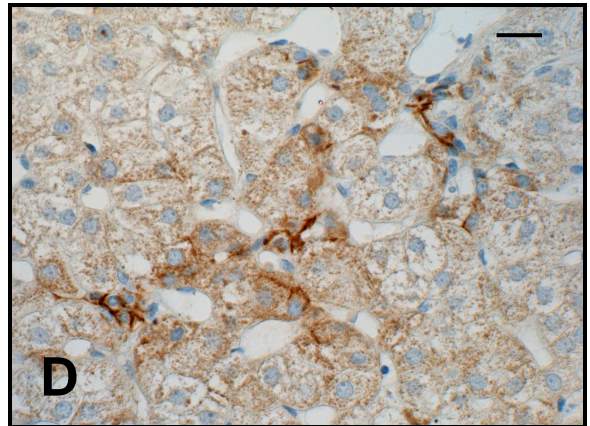
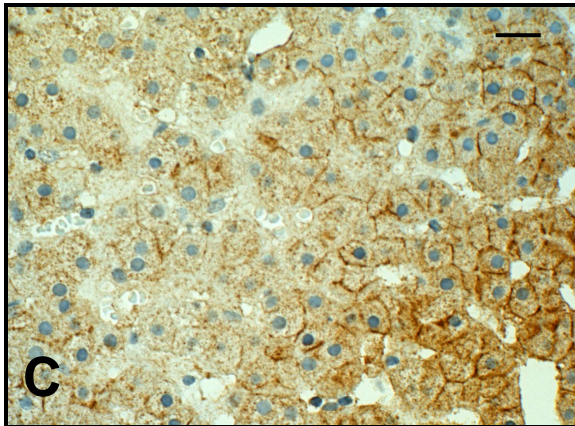
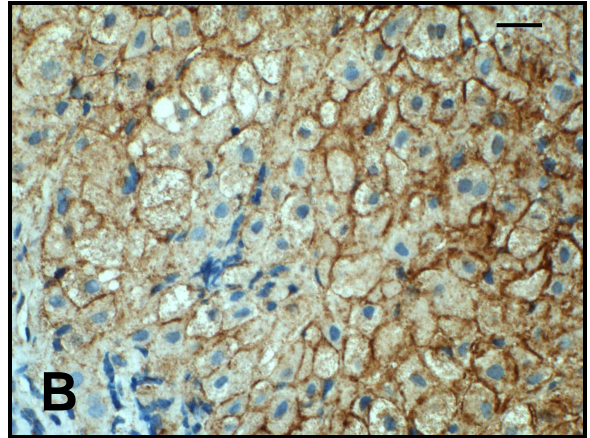
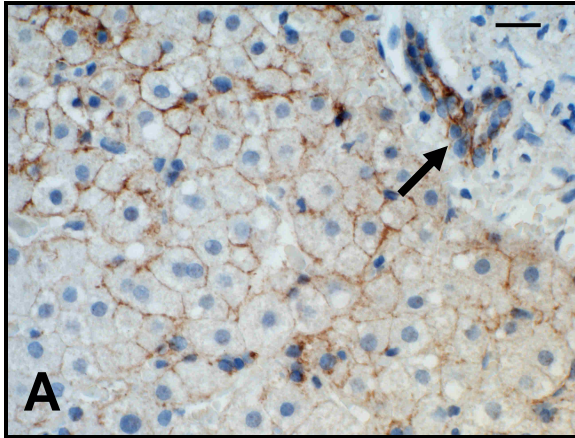
### Immunocytochemiczna lokalizacja $\beta$ -kateniny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (pzw C).

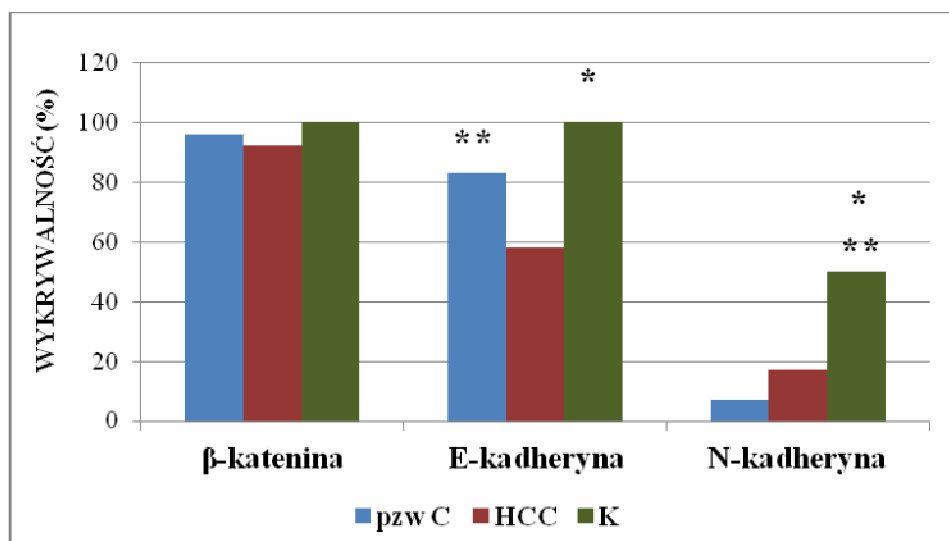
Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu$ m.

(**A-H**) Fragmenty biopatów wątroby pacjentów z grupy badanej (pzw C).

Błonowy wzór reakcji IHC na  $\beta$ -kateninę w większości hepatocytów fragmentu miąższu wątroby (**A, B, C**); błonowo-cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka (**D**). Reakcję IHC na  $\beta$ -kateninę obserwowano w bocznych i szczytowych częściach błon komórkowych sąsiadujących hepatocytów. Ekspresja  $\beta$ -kateniny w miąższu wątroby dotyczyła również wyłącznie cytoplazmy komórek wątrobowych (**E, F**), w tym komórek z dużym zwyrodnieniem tłuszczowym (**E**). Pozytywną i intensywniejszą niż w hepatocytach reakcję IHC na  $\beta$ -kateninę obserwowano w komórkach nabłonka przewodów żółciowych międzyzrazikowych w przestrzeniach bramnożółciowych (**A, E, H**, strzałki).

**A** – pacjent nr 50 z marskością wątroby; **B** – pacjent nr 48 z marskością wątroby; **C** – pacjent nr 39; **D** – pacjent nr 59; **E** – pacjentka nr 55; **F** – pacjent nr 56; **G** – pacjentka nr 62 z marskością wątroby; **H** – pacjent nr 49.





**Rycina 5.** Porównanie częstości występowania (wykrywalności) β-kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny w biopsjach wątroby pacjentów z badanych grup; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

Ekspresja β-kateniny w tej grupie chorych była wyjątkowo zróżnicowana pod względem liczby komórek i intensywności reakcji immunocytochemicznej – od pojedynczych komórek o słabym nasileniu, do intensywnie zabarwionych neoplastycznych komórek wątroby. Dominował błonowy wzór reakcji IHC (64%), choć widoczne były również immunopoztywne komórki z cytoplazmatyczną (14%) i mieszaną błonowo-cytoplazmatyczną lokalizacją sygnału (22%) (**Tablica 2A-C; Rycina 6**). Obecność jądrowej ekspresji β-kateniny obserwowano w nielicznych komórkach HCC i u pojedynczych chorych (**Tablica 2H**).

W grupie kontrolnej wykrywalność β-kateniny wynosiła 100%. Fragmenty kontrolnej wątroby cechowały się z reguły bardzo zróżnicowaną pod względem ilościowym, pozytywną reakcją IHC, od śladowej do bardzo intensywnej reakcji immunocytochemicznej na β-kateninę, obejmującej większość komórek wątrobowych w zraziku narządu. Przeważała błonowa lokalizacja białka (75%) w hepatocytach (**Tablica 3A-D**). U dwóch pacjentów wykazano wyłącznie cytoplazmatyczną reakcję na to białko (**Rycina 6**).

## Tablica 2.

### Immunocytochemiczna lokalizacja $\beta$ -kateniny w wątrobie pacjentów z pierwotnym rakiem wątroby (HCC).

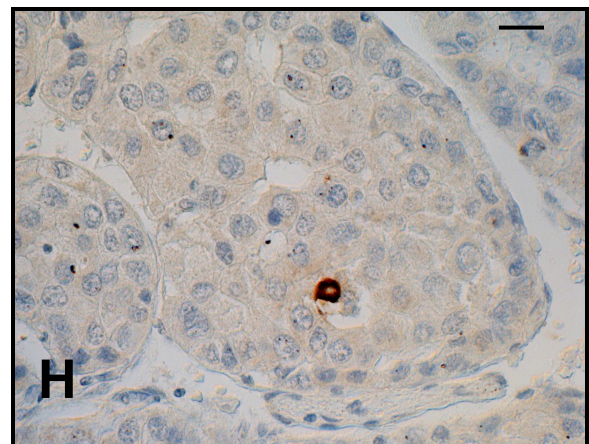
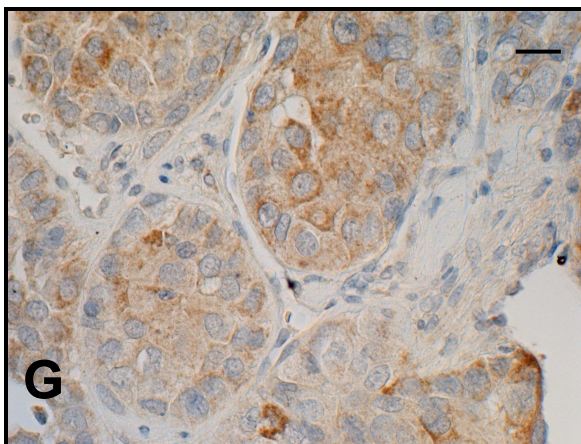
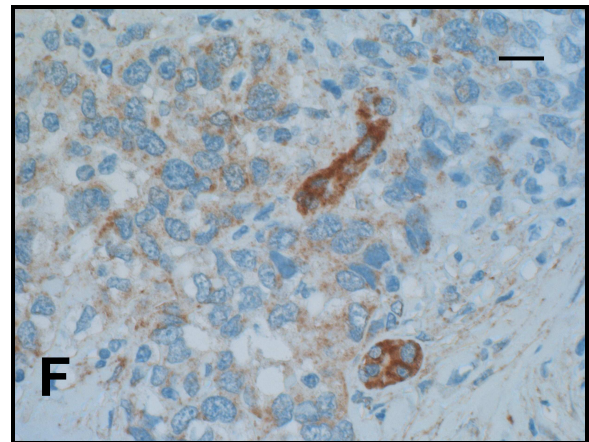
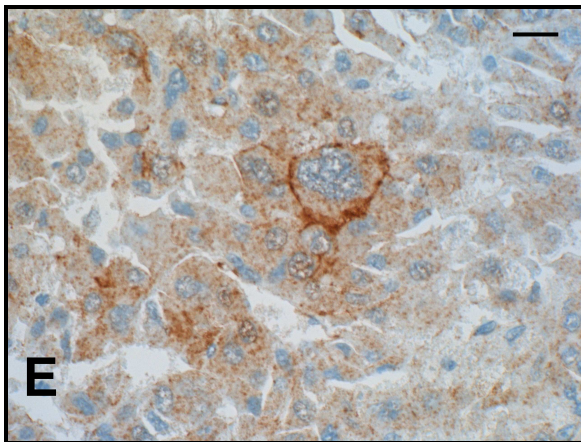
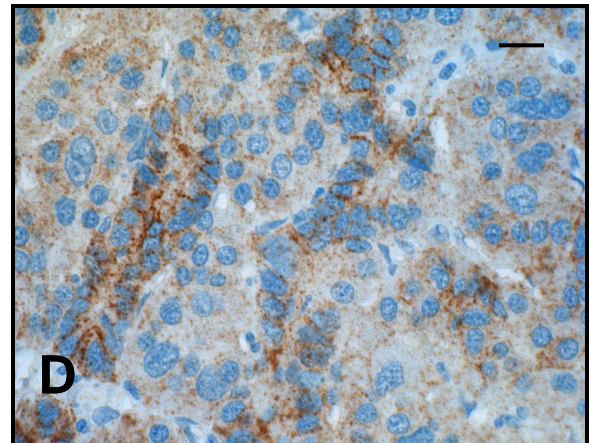
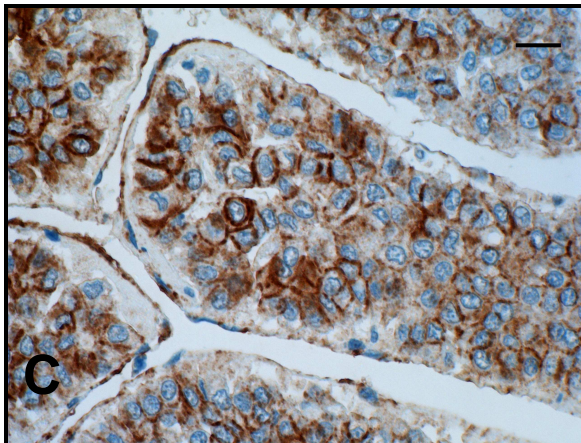
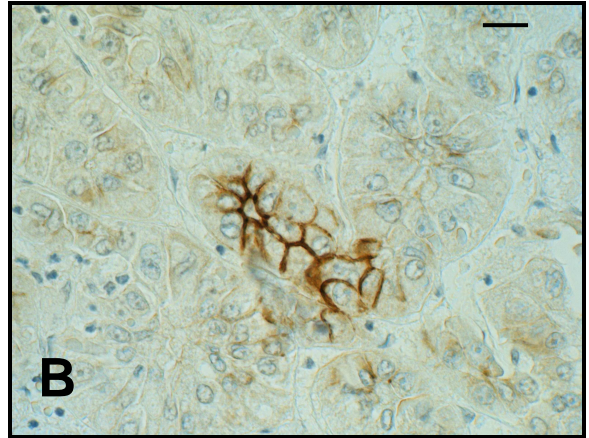
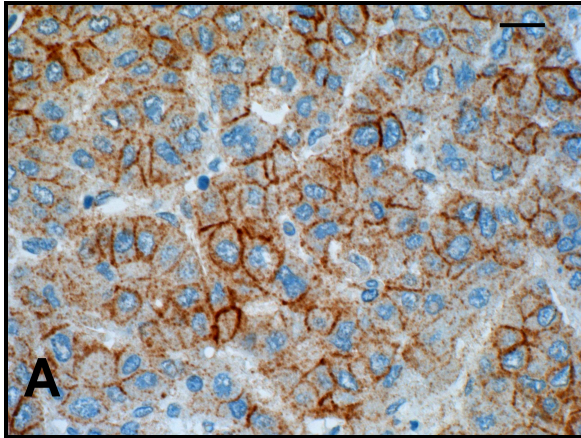
Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu$ m.

**(A-H)** Fragmenty wątroby z panelu tkankowego (*tissue microarray*) oraz z archiwalnych kostek parafinowych od pacjentów z HCC.

Silny błonowy wzór reakcji IHC na  $\beta$ -kateninę w większości neoplastycznych komórek lub w ogniskowo ułożonych transformowanych komórkach wątroby **(A, B)**; zwraca uwagę intensywniejsza reakcja w bocznych i szczytowych częściach błon sąsiadujących komórek nowotworowych.

Silna **(C)** i słabsza **(D, E)** błonowo-cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka. Pozytywną i intensywniejszą, niż w sąsiadujących komórkach nowotworowych, reakcję IHC na  $\beta$ -kateninę obserwowano w komórkach przypominających cholangiocyty **(F)**. Cytoplazmatyczna ekspresja  $\beta$ -kateniny w transformowanych komórkach wątrobowych **(G)**, a także w pojedynczych jądrach komórkowych **(H)**.

**A** – pacjent nr 44 (grade 2); **B** – pacjent nr 59 (grade 1); **C** - pacjent nr 52 (grade 1); **D** - pacjent nr 44 (grade 2); **E** – pacjent nr 21 (grade 2); **F** – pacjent nr 39 (grade 3); **G, H** – pacjent nr 61 (grade 2).



### Tablica 3.

#### Immunocytochemiczna lokalizacja $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny w wątrobie kontrolnej.

Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną (A-D, G, H). Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu$ m.

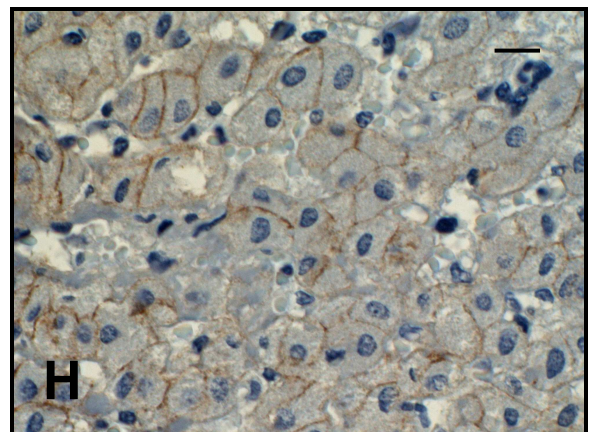
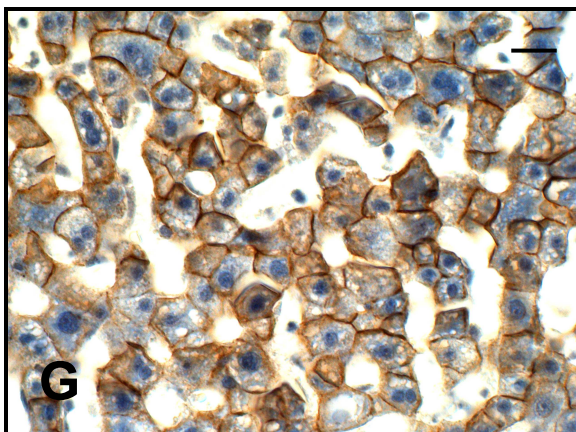
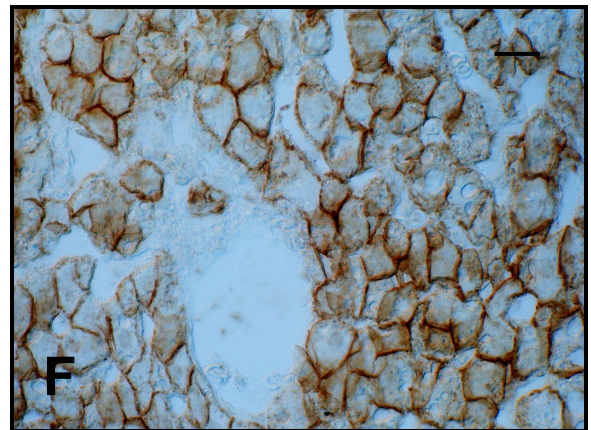
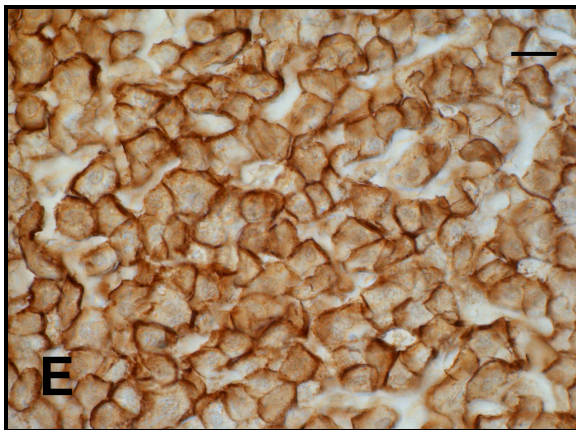
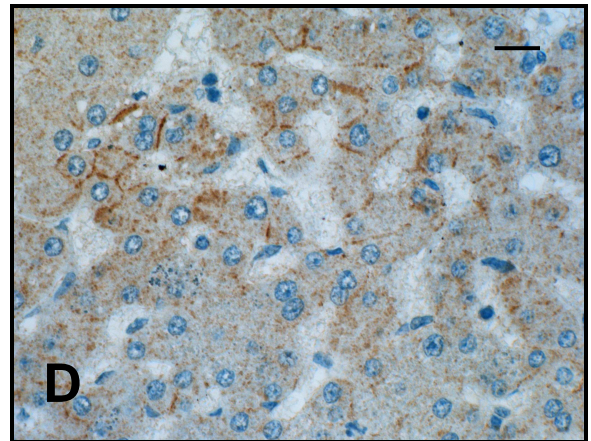
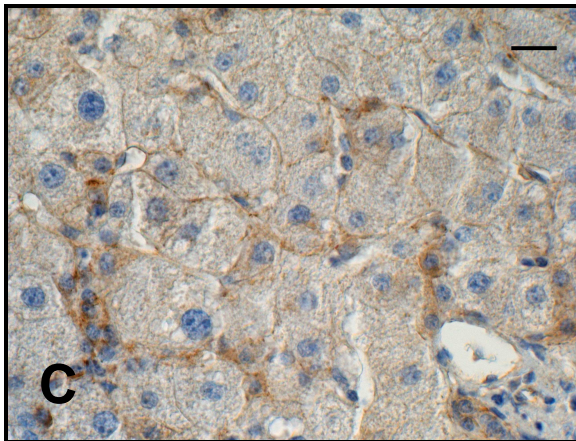
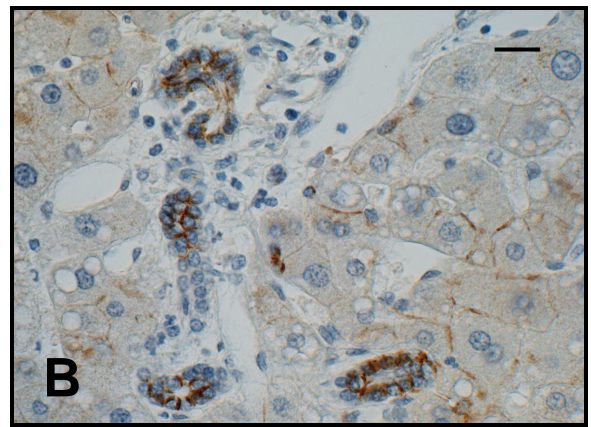
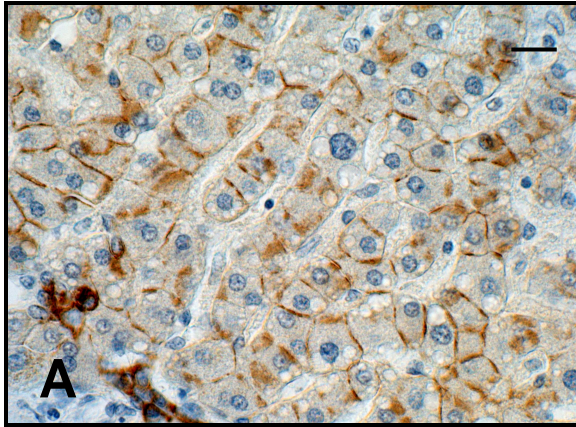
Fragmety biopłatów wątroby pacjentów z grupy kontrolnej z pozytywną lokalizacją  $\beta$ -kateniny (A-D), E-kadheryny (E, F) oraz N-kadheryny (G, H).

Obserwowano zarówno błonowy wzór reakcji IHC na  **$\beta$ -katenine** w licznych hepatocytach (głównie na bocznych powierzchniach sąsiadujących komórek) (A, C, D), nieco intensywniejszą reakcję w nabłonku przewodów żółciowych międzyzrazikowych (B), jak i błonowo-cytoplazmatyczną lokalizację tego białka (D).

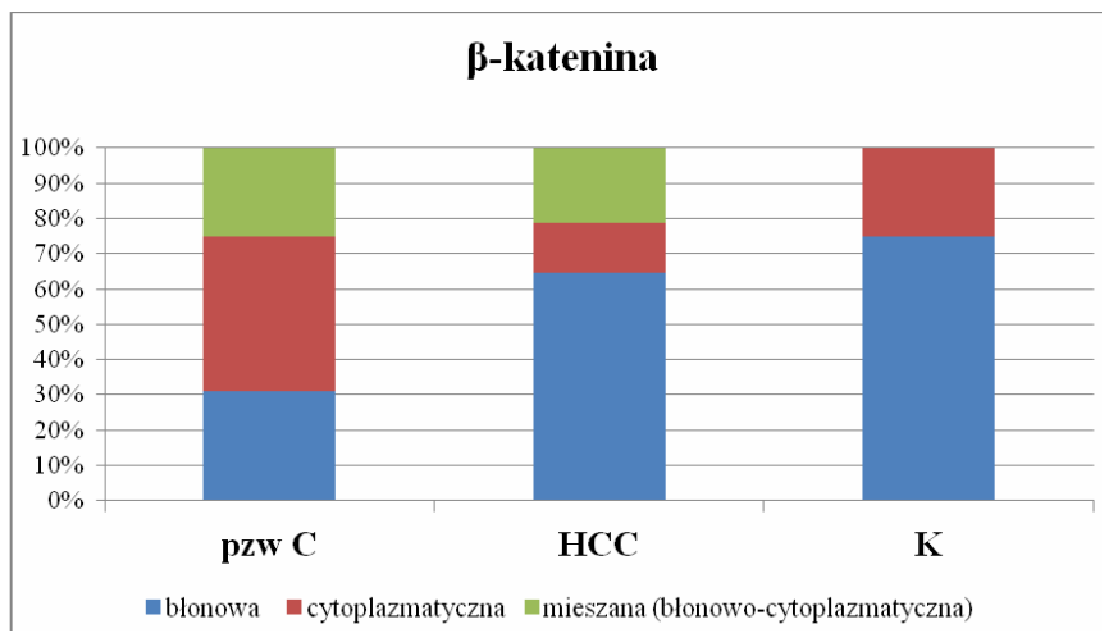
Ekspresja **E-kadheryny** w miększu kontrolnej wątroby dotyczyła również w większości błon komórkowych (E, F).

Immunocytochemiczna lokalizacja **N-kadheryny** widoczna była na błonach komórkowych większości hepatocytów (G), bądź ogniskowo ułożonych komórek (H). Ekspresję obu kadheryn wykrywano w bocznych i szczytowych fragmentach błon komórkowych.

*A, B – pacjent kontrolny nr 8; C - pacjent kontrolny nr 7; D - pacjentka kontrolna nr 6; E - pacjent kontrolny nr 2; F – pacjentka kontrolna nr 1; G – pacjent kontrolny nr 2; H – pacjent kontrolny nr 5.*







**Rycina 6.** Udział procentowy zróżnicowanych postaci komórkowej lokalizacji **β-kateniny** u pacjentów z grupy z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C), raku pierwotnym wątroby (HCC) oraz kontroli.

Analiza ilościowa wykazała najwyższą ekspresję β-kateniny w kontroli tkankowej ( $25,37 \pm 26,97\%$  reakcji), kolejno niższą w grupie z pzw C ( $7,00 \pm 7,41\%$  reakcji) i najniższą w guzach wątroby (HCC) ( $5,71 \pm 9,44\%$  reakcji) (**Rycina 7, Tabele 5-8**).

Ekspresja β-kateniny w grupie z pzw C nie różniła się istotnie w porównaniu z kontrolą ( $p=0,172$ ). Znamienne niższą ekspresję obserwowano natomiast w komórkach HCC zarówno w porównaniu z kontrolą ( $p=0,02$ ), jak i grupą z pzw C ( $p=0,005$ ) (**Rycina 7**).

**Tabela 5.** Porównanie tkankowej ekspresji badanych białek:  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole miąższu wątroby) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C), w guzach wątroby (HCC) oraz w kontroli.

<b>Białko adhezyjne</b>	<b>Grupa badana</b>	<b>n</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min.</b>	<b>Maks.</b>	<b>SD</b>
<b><math>\beta</math>-katenina</b>	pzw C	54	7,00	3,69	0,00	28,75	7,41
	HCC	61	5,71	1,63	0,00	44,95	9,44
	kontrola	8	25,37	19,80	0,43	69,64	26,97
<b>E-kadheryna</b>	pzw C	41	1,78	0,42	0,00	8,61	2,67
	HCC	60	1,95	0,01	0,00	78,80	10,49
	kontrola	7	9,47	8,23	0,03	24,73	9,93
<b>N-kadheryna</b>	pzw C	28	0,19	0,00	0,00	3,92	0,78
	HCC	59	0,55	0,00	0,00	14,35	2,16
	kontrola	8	1,22	0,69	0,00	4,04	1,54

*Objaśnienia:* min. - wartość minimalna; maks. - wartość maksymalna; SD - odchylenie standardowe; HCC – rak wątrobowokomórkowy

**Tabela 6.** Porównanie tkankowej ekspresji badanych białek:  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole miąższu wątroby) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C) i kontroli (średnia $\pm$ SD).

<b>Białko adhezyjne</b>	<b>pzw C</b>	<b>Kontrola</b>	<b>p</b>
<b><math>\beta</math>-katenina</b>	7,00 $\pm$ 7,41	25,37 $\pm$ 26,97	0,172
<b>E-kadheryna</b>	1,78 $\pm$ 2,67	9,47 $\pm$ 9,93	0,045
<b>N-kadheryna</b>	0,19 $\pm$ 0,78	1,22 $\pm$ 1,54	0,064

*Objaśnienia:* p – poziom istotności

**Tabela 7.** Porównanie tkankowej ekspresji badanych białek:  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole miąższu wątroby) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i HCC (średnia $\pm$ SD).

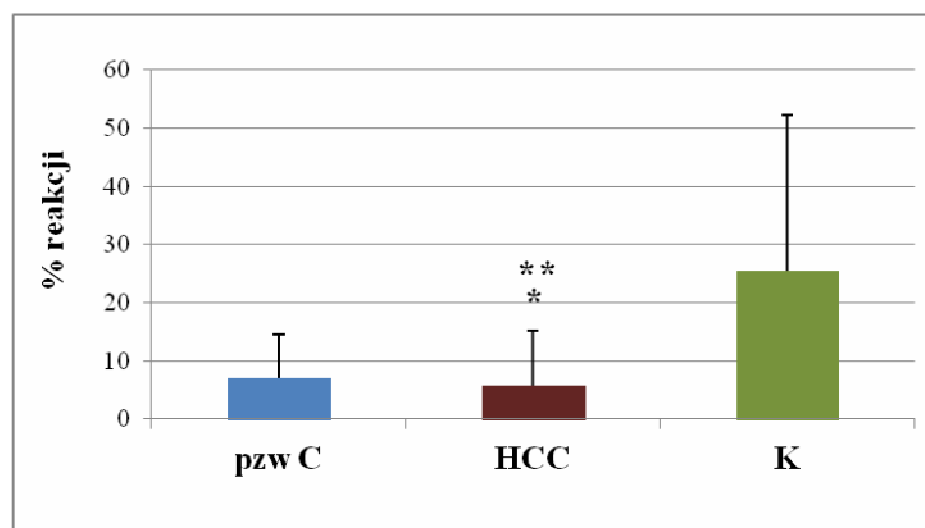
Białko adhezyjne	pzw C	HCC	p
$\beta$ -katenina	7,00 $\pm$ 7,41	5,71 $\pm$ 9,44	0,005
E-kadheryna	1,78 $\pm$ 2,67	1,95 $\pm$ 10,49	<0,001
N-kadheryna	0,19 $\pm$ 0,78	0,55 $\pm$ 2,16	0,484

*Objaśnienia: p – poziom istotności*

**Tabela 8.** Porównanie tkankowej ekspresji badanych białek:  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole miąższu wątroby) u chorych z HCC i kontrolą (średnia $\pm$ SD).

Białko adhezyjne	HCC	Kontrola	p
$\beta$ -katenina	5,71 $\pm$ 9,44	25,37 $\pm$ 26,97	0,02
E-kadheryna	1,95 $\pm$ 10,49	9,47 $\pm$ 9,93	<0,001
N-kadheryna	0,55 $\pm$ 2,16	1,22 $\pm$ 1,54	0,103

*Objaśnienia: p – poziom istotności*



**Rycina 7.** Porównanie ekspresji  $\beta$ -kateniny w wątrobie pacjentów z grupy badanej (pzw C), z pierwotnym rakiem wątroby (HCC) i w kontroli. \* - p<0,05; \*\* - p<0,01.

W obrębie badanych grup nie stwierdzono różnic w nasileniu ekspresji  $\beta$ -kateniny w zależności od płci (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Ekspresja tkankowa  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny wyrażona w % reakcji na pole miąższu wątroby (średnia  $\pm$ SD) u chorych (kobiety vs. mężczyźni) z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C), rakiem wątrobowokomórkowym (HCC) i w kontroli.

	Grupa	Kobiety		Mężczyźni		p
		N		n		
<b><math>\beta</math>-katenina</b>	pzw C	27	6,75 $\pm$ 7,61	27	7,24 $\pm$ 7,34	0,959
	HCC	13	6,67 $\pm$ 12,07	46	5,45 $\pm$ 8,73	0,595
	Kontrola	2	20,12 $\pm$ 19,29	6	27,13 $\pm$ 30,48	*-
<b>E-kadheryna</b>	pzw C	23	1,51 $\pm$ 2,72	18	2,12 $\pm$ 2,63	0,068
	HCC	13	6,29 $\pm$ 21,80	47	0,74 $\pm$ 3,22	0,958
	Kontrola	2	12,43 $\pm$ 17,40	5	8,28 $\pm$ 8,13	*-
<b>N-kadheryna</b>	pzw C	15	0,09 $\pm$ 0,35	13	0,30 $\pm$ 1,09	0,964
	HCC	12	0,35 $\pm$ 0,83	47	0,60 $\pm$ 2,39	0,649
	Kontrola	2	2,02 $\pm$ 2,86	6	0,95 $\pm$ 1,15	*-

**Objaśnienia:** n – liczba osób w grupie; SD – odchylenie standardowe; \* - za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

### 3.2. E-kadheryna

U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, ekspresję E-kadheryny wykazano u 34/41 pacjentów (83%). Obecność tego białka adhezyjnego w HCC wykazano u 35/60 pacjentów (58%) i we wszystkich wątrobach z grupy kontrolnej (100%). Znamiennej najniższej wykrywalności tego białka w wątrobie dotyczyli pacjenci z HCC i to zarówno w odniesieniu do kontroli, jak i pzw C ( $p < 0,05$  w obu przypadkach) (**Rycina 5**).

U pacjentów z pzw C komórkowa lokalizacja E-kadheryny dotyczyła również w przewodzie błon komórkowych (56% przypadków), ale również cytoplazmy hepatocytów i cholangiocytów (18% pacjentów) (**Tablica 4 A-G**). Mieszana błonowo-cytoplazmatyczna reakcja IHC występowała u 9 pacjentów z grupy badanej (26%) (**Tablica 4 D; Rycina 8**).

#### **Tablica 4.**

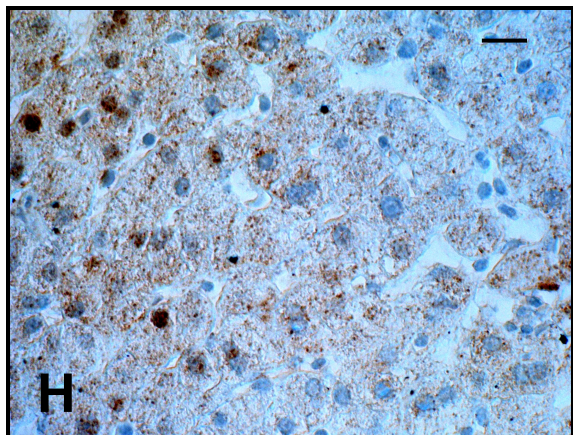
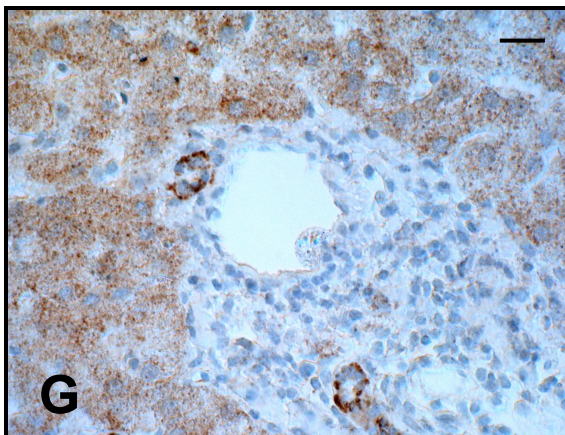
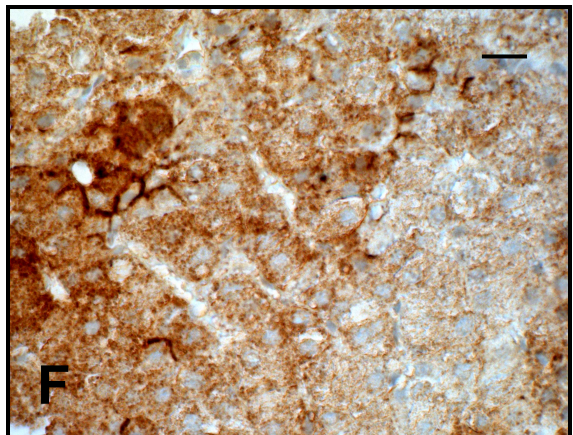
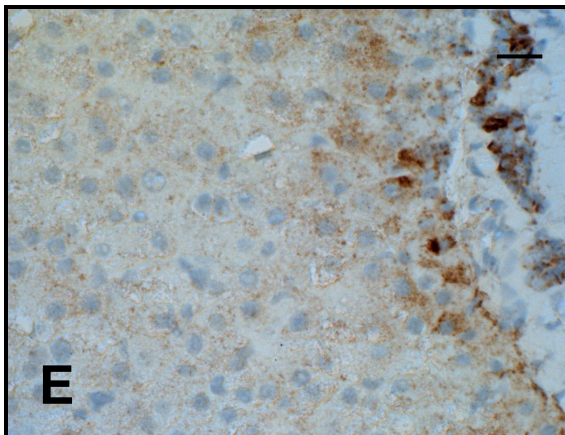
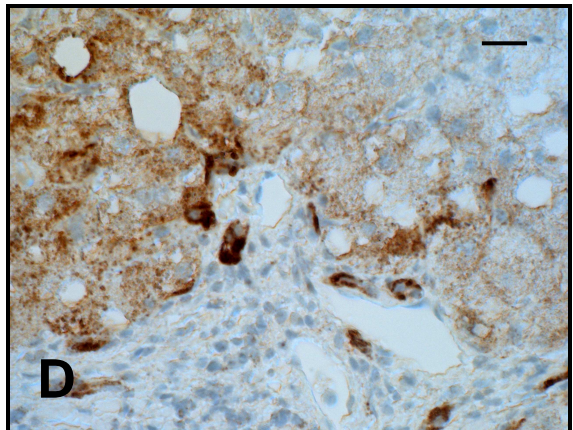
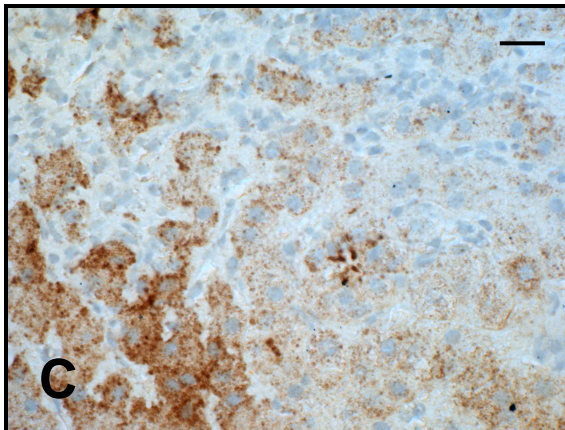
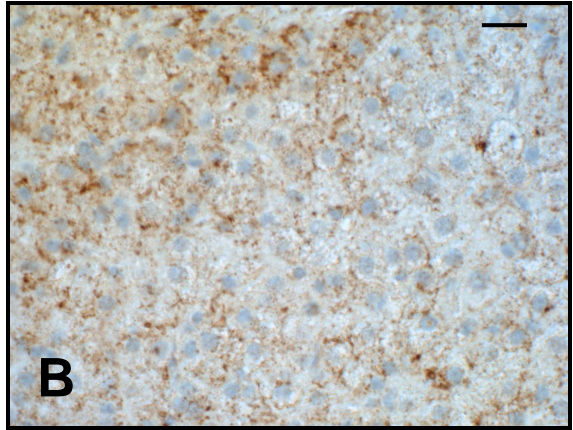
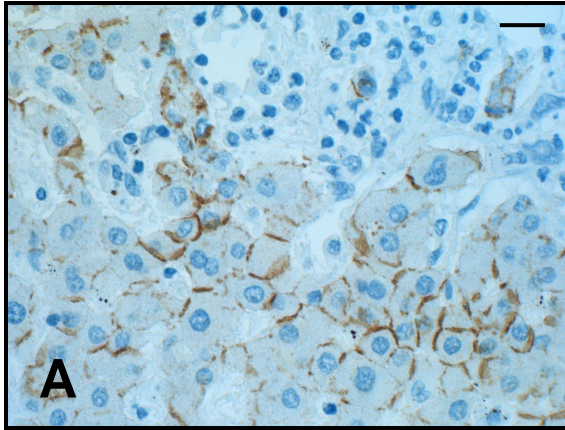
##### **Immunocytochemiczna lokalizacja E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (pzw C).**

Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu\text{m}$ .

**(A-H)** Fragmenty bioptatów wątroby pacjentów z grupy badanej (pzw C).

Wyraźny błonowy wzór reakcji IHC na E-kadherynę w miększu wątroby (**A**); słabszy sygnał na to białko w licznych błonach komórek wątrobowych (**B**); błonowo-cytoplazmatyczna lokalizacja E-kadheryny o zróżnicowanym nasileniu reakcji (**C**, **D**). Intensywniejsza niż zlokalizowana wewnątrzrazikowo, reakcja IHC na E-kadherynę w hepatocytach blaszki granicznej i w cholangiocytach (**D**, **E**, **G**); dominująca cytoplazmatyczna reakcja na E-kadherynę w komórkach wątrobowych (**F**, **G**); jądrowo-cytoplazmatyczna reakcja na E-kadherynę u jednego z pacjentów z grupy badanej (**H**).

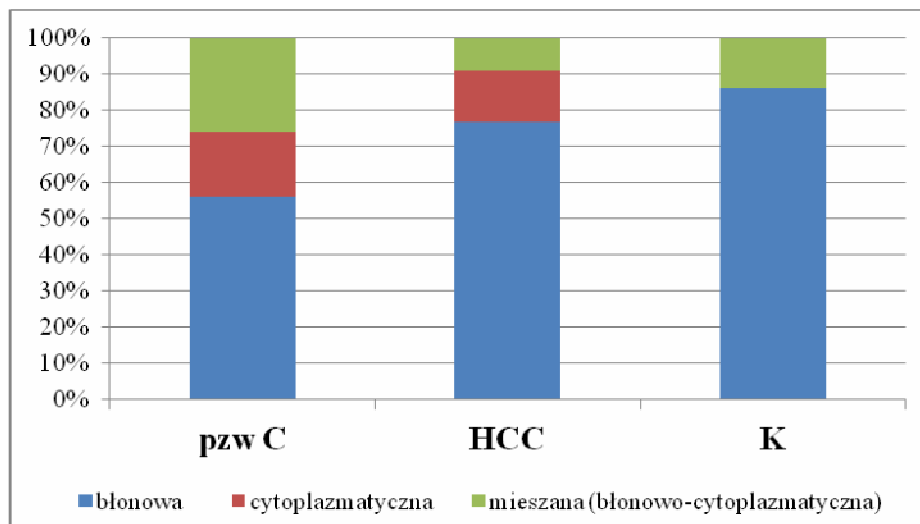
*A – pacjent nr 30; B – pacjentka nr 21; C - pacjentka nr 16; D - pacjentka nr 18 z marskością wątroby; E – pacjentka nr 22; F – pacjent nr 19; G – pacjent nr 25; H – pacjent nr 34.*



Intensywność reakcji oraz odsetek komórek immunopozytywnych w mięszu wątroby, podobnie jak w przypadku  $\beta$ -kateniny, były zróżnicowane indywidualnie.

W komórkach HCC ekspresja E-kadheryny dotyczyła błon i cytoplazmy zmienionych nowotworowo komórek mięszu wątroby (**Tablica 5 A-H**). Błonowa reakcja na to białko występowała w większości zmienionych nowotworowo narządów (77%), cytoplazmatyczna w 14% HCC i w 3 przypadkach (9%) tego guza wykazano mieszaną błonowo-cytoplazmatyczną lokalizację E-kadheryny (**Rycina 8**).

We fragmentach wątroby kontrolnej ekspresja E-kadheryny widoczna była głównie na błonach komórkowych hepatocytów i cholangiocytów (**Tablica 3 E i F**). Przeważała reakcja błonowa (86% przypadków) (**Rycina 8**). W jednej wątrobie występowała reakcja mieszana (błonowo-cytoplazmatyczna). Reakcja IHC na to białko była w większości rozsziana, zróżnicowana pod względem intensywności i liczby immunopozytywnych komórek w zależności od pacjenta.



**Rycina 8.** Udział procentowy zróżnicowanych wzorów komórkowej lokalizacji **E-kadheryny** u pacjentów z grupy badanej z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C), raku pierwotnym wątroby (HCC) oraz w kontroli.

Ilościowa analiza komórkowej ekspresji E-kadheryny wykazała znamienne niższą średnią wartość ekspresji w grupie badanej zarówno w stosunku do kontroli, jak i HCC ( $p < 0,05$  w obu przypadkach) (**Tabela 6 i 7**). Ekspresja E-kadheryny w HCC była również istotnie niższa w porównaniu z kontrolą ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 8**).

## Tablica 5.

### Immunocytochemiczna lokalizacja E-kadheryny w wątrobie pacjentów z pierwotnym rakiem wątroby (HCC).

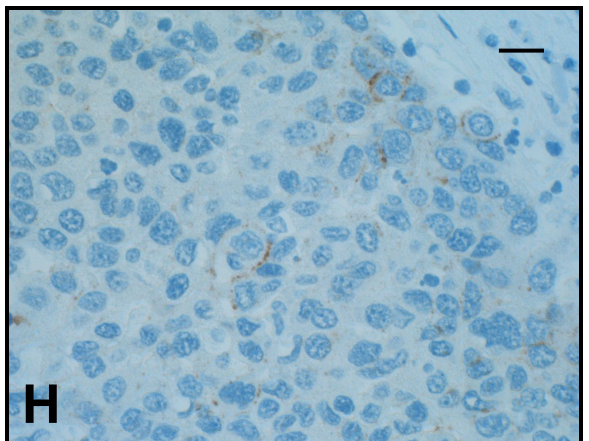
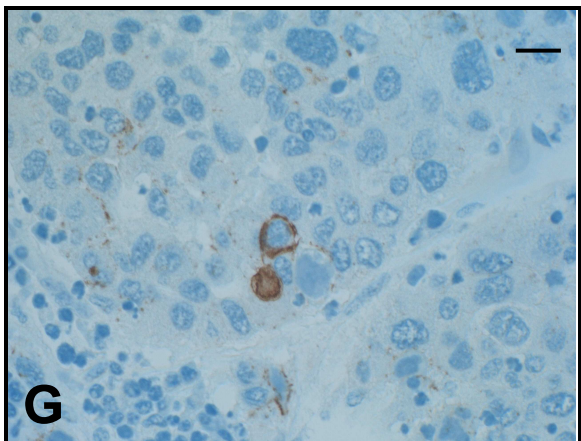
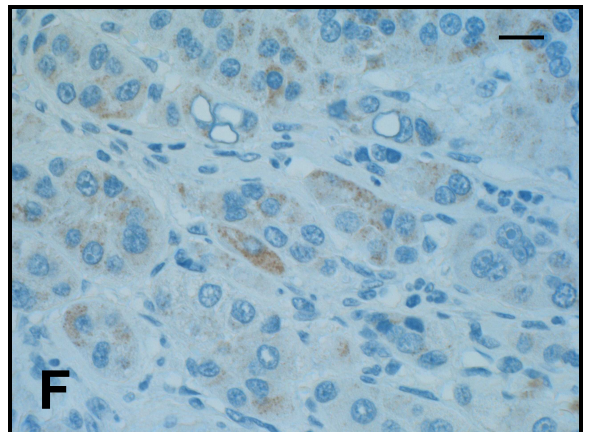
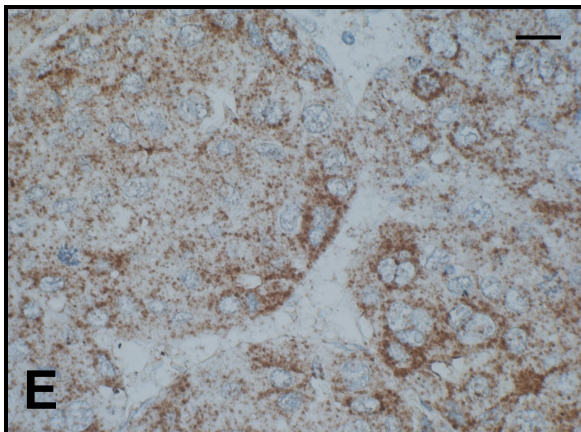
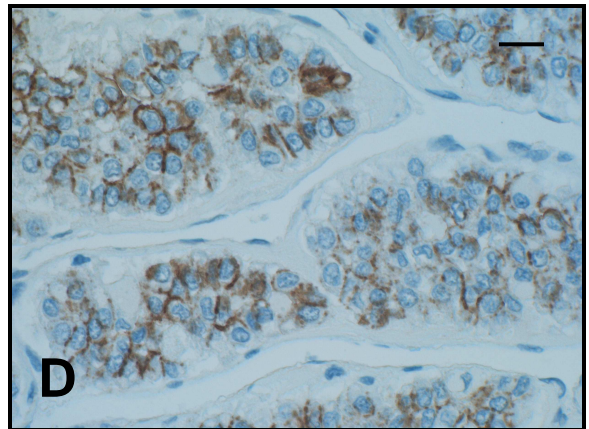
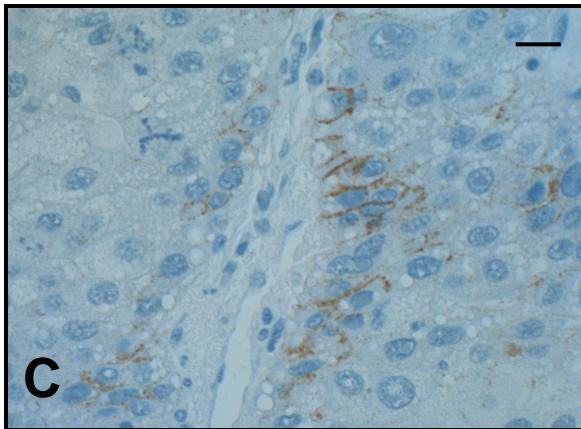
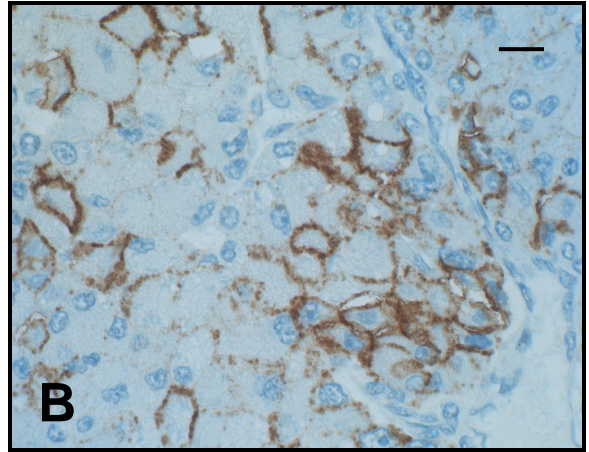
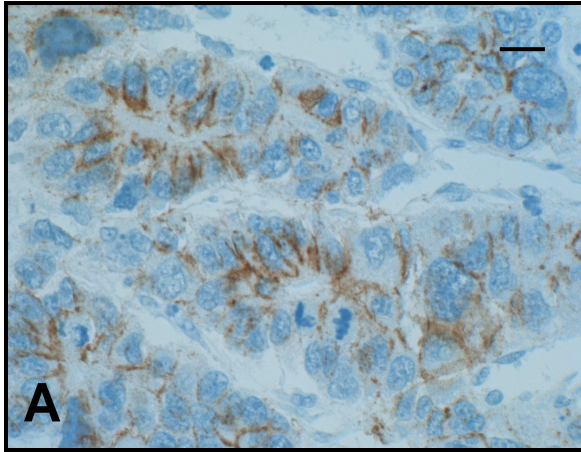
Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu\text{m}$ .

**(A-H)** Fragmenty wątroby z panelu tkankowego (*tissue microarray*) oraz z archiwalnych kostek parafinowych od pacjentów z HCC.

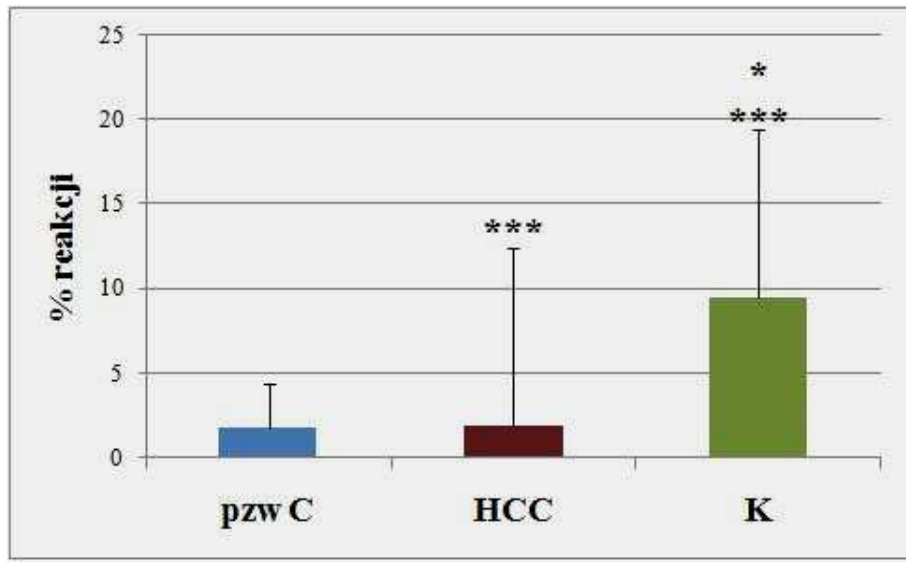
Błonowy wzór reakcji IHC na E-kadherynę w licznych **(A, B)** lub w pojedynczych transformowanych komórkach wątroby **(C)**; zwraca uwagę intensywniejsza reakcja w bocznych i szczytowych częściach błon sąsiadujących komórek nowotworowych; Błonowo-cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka **(D)**. Pozytywna cytoplazmatyczna reakcja IHC na E-kadherynę w licznych **(E)** lub słaba reakcja IHC w pojedynczych komórkach neoplastycznych **(F)**. Ekspresja E-kadheryny w miększu wątroby dotyczyła również pojedynczych jąder komórkowych lub okolicy otoczki jądrowej u pojedynczych chorych **(G)**; śladowa reakcja na E-kadherynę w komórkach HCC **(H)**.

**A** – pacjentka nr 15 (grade 2); **B** – pacjent nr 26 (grade 2); **C** - pacjent nr 28 (grade 2); **D** - pacjent nr 52 (grade 1); **E** – pacjent nr 61 (grade 2); **F** – pacjent nr 44 (grade 2); **G, H** – pacjentka nr 24 (grade 2).





Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w zależności od płci ani w grupie badanej, ani w HCC (Tabela 9).



**Rycina 9.** Tkankowa ekspresja **E-kadheryny** u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, w pierwotnym raku wątroby (HCC) oraz w kontroli.

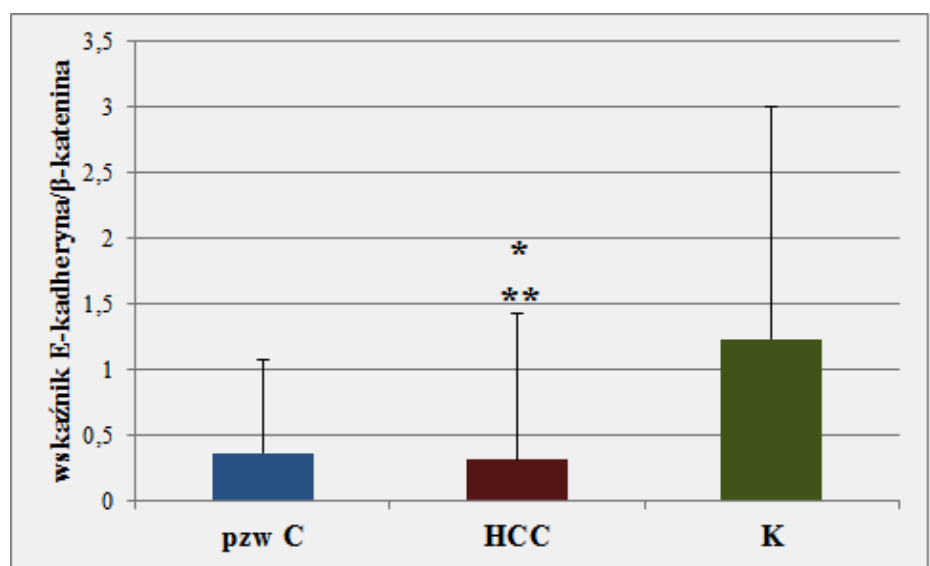
### 3.3. Wskaźnik *E-kadheryna/β-katenina*

W wątrobie pacjentów z pzw C, HCC oraz kontroli obliczono również wskaźnik *E-kadheryna/β-katenina* (Tabela 10). Najniższy indeks wykazano u pacjentów z HCC. Różnice znamienne zanotowano w tej grupie w porównaniu z grupą z pzw C oraz kontrolą ( $p < 0,05$  w obu przypadkach). Nie było istotnej różnicy w wartości wskaźnika pomiędzy grupą pzw C a kontrolą ( $p = 0,17$ ) (Tabela 10; Rycina 10).

**Tabela 10.** Wartości wskaźnika **E-kadheryna/β-katenina** w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, HCC i kontroli.

Grupa	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
pzw C	37	0,36*	0,13	0,00	3,91	0,71
HCC	55	0,31	0,01	0,00	6,95	1,12
kontrola	7	1,23**	0,30	0,02	4,63	1,77

**Objaśnienia:** n – liczba osób, SD – odchylenie standardowe; \* -  $p < 0,001$  pomiędzy grupą HCC i pzw C; \*\* –  $p < 0,01$  pomiędzy HCC i kontrolą.



**Rycina 10.** Porównanie wartości wątrobowego wskaźnika **E-kadheryna/β-katenina** u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, HCC i wątrobie kontrolnej; \*\* -  $p < 0,01$

U pacjentów z HCC analizowanych w pracy nie obserwowano znamienych różnic w wartości wskaźnika E-kadheryna/β-katenina ani w zależności od wieku ( $r=0,120$ ;  $p>0,05$ ) ani od złośliwości histologicznej guza (*GRADE*) ( $r=-0,157$ ;  $p>0,05$ ).

### 3.4. N-kadheryna

We fragmentach wątroby analizowanych immunocytochemicznie, białko to wykryto u zaledwie dwóch na 28 przebadanych pod tym kątem pacjentów zakażonych HCV (7%), u 10/59 pacjentów z HCC (17%) oraz w 4/8 fragmentach wątroby kontrolnej (50%). W przypadku tego białka adhezyjnego, istotne różnice w częstości występowania obserwowano pomiędzy

kontrolą (więcej pozytywnych przypadków) niż pzw C oraz rakami wątroby ( $p < 0,05$  w obu przypadkach) (**Rycina 5**).

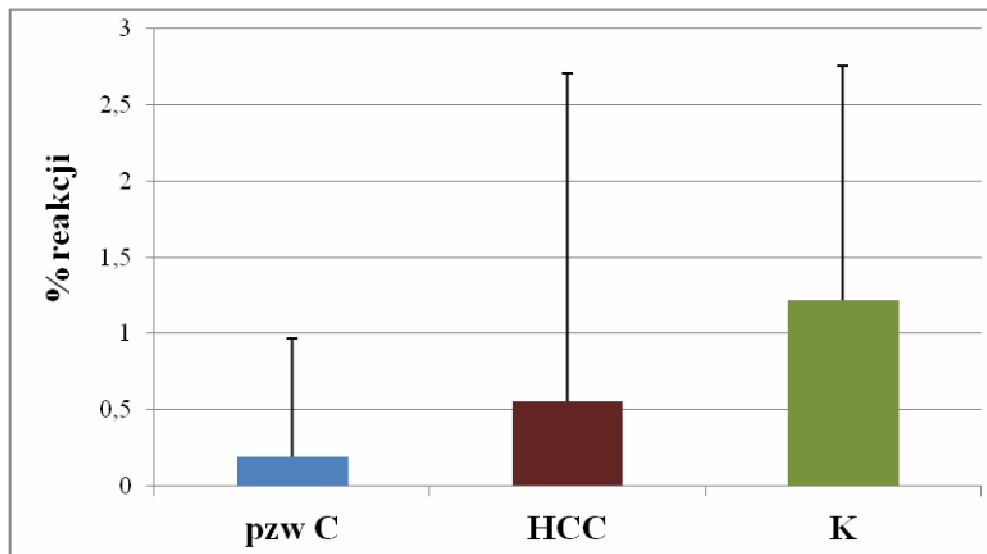
Biorąc pod uwagę lokalizację komórkową tego białka, ekspresja ta różniła się pomiędzy grupami. W wątrobie z pzw C u jedynie dwóch chorych z pozytywną reakcją IHC na to białko, ekspresję N-kadheryny obserwowano w cytoplazmie nielicznych hepatocytów.

W wątrobie kontrolnej dominowała ekspresja w błonach komórek wątrobowych (**Tablica 3 G i H**).

W komórkach HCC lokalizacja N-kadheryny dotyczyła błon komórek nowotworowych (4 chorych), a w 6 guzach wątroby występowała mieszana błonowo-cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka (**Tablica 6 A-F**).

U pacjentów z grupy badanej i HCC nie stwierdzono różnic w ekspresji N-kadheryny w zależności od płci ( $p = 0,964$ ;  $p = 0,649$ , odpowiednio).

Analiza ilościowa ekspresji N-kadheryny nie wykazała istotnych różnic w ekspresji tego białka pomiędzy pacjentami zakażonymi HCV, kontrolą a guzami wątroby, co przedstawiono na Rycinie 11.



**Rycina 11.** Porównanie tkankowej ekspresji N-kadheryny u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV, w pierwotnym raku wątroby (HCC) i w kontroli (K).

## Tablica 6.

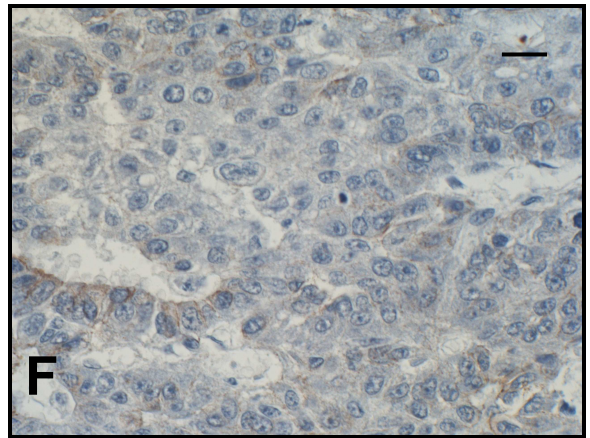
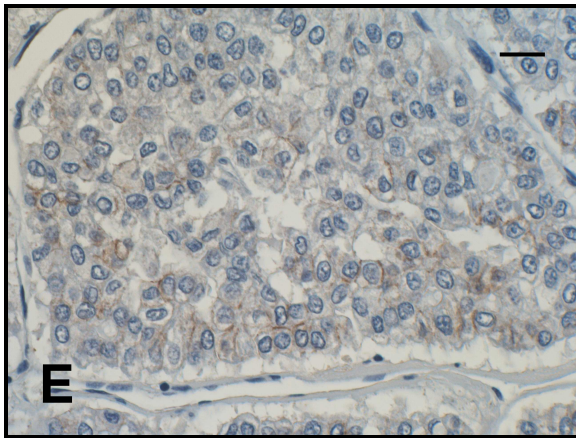
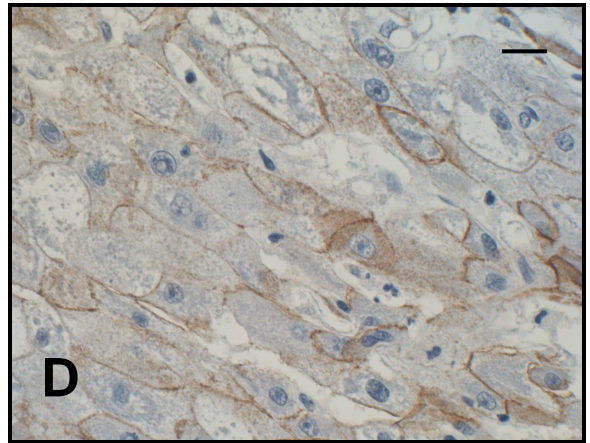
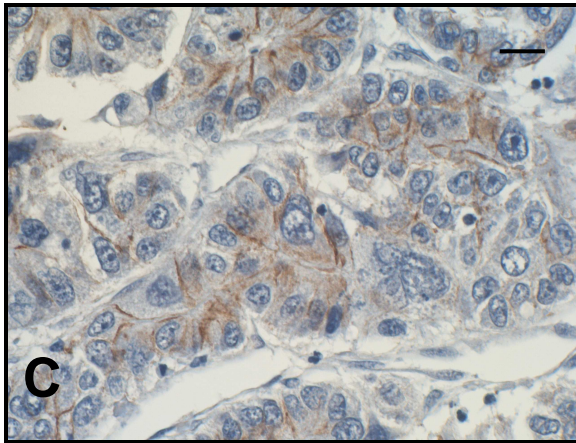
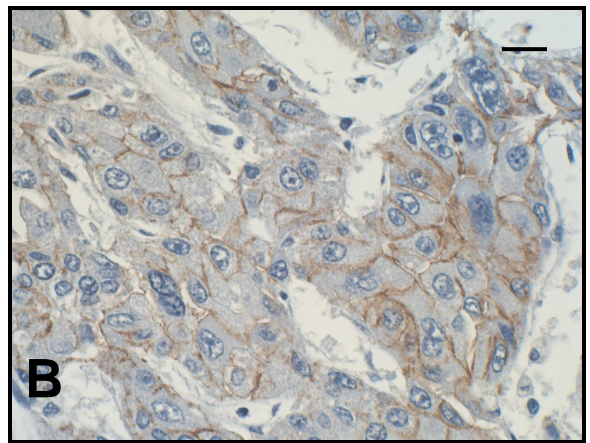
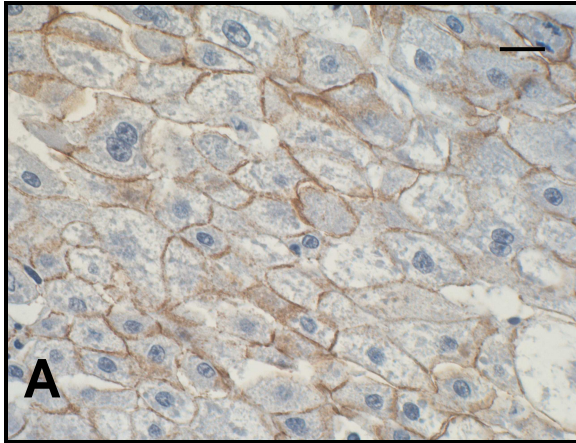
### Immunocytochemiczna lokalizacja N-kadheryny w wątrobie pacjentów z pierwotnym rakiem wątroby (HCC).

Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu\text{m}$ .

**(A-F)** Fragmenty wątroby z panelu tkankowego (*tissue microarray*) oraz z archiwalnych kostek parafinowych od pacjentów z grupy HCC.

Błonowy wzór reakcji IHC na N-kadherynę w licznych transformowanych komórkach wątroby (**A, B**); Błonowo-cytoplazmatyczna lokalizacja tego białka (**C, D**); Śladowa, głównie błonowa lokalizacja N-kadheryny w komórkach HCC (**E, F**).

*A – pacjent nr 55 (grade 3); B – pacjent nr 14 (grade 2); C - pacjentka nr 15 (grade 2); D - pacjent nr 55 (grade 3); E – pacjent nr 52 (grade 1); F – pacjent nr 37 (grade 2).*



#### **4. Hybrydocytochemiczna analiza ekspresji $\beta$ -kateniny**

Ekspresję tkankową białek adhezyjnych na poziomie mRNA wykonano tylko w przypadku  $\beta$ -kateniny i dotyczyła ona pacjentów z HCC, pacjentów z pzw C oraz kontrolnych biopłatów wątroby. Obecność mRNA dla  $\beta$ -kateniny potwierdzono we wszystkich badanych fragmentach wątroby.

Zarówno w wątrobie z zakażeniem HCV (**Tablica 7 A-D**), jak i w przypadku wątroby zmienionej nowotworowo wykazano głównie jądrowo-cytoplazmatyczną lokalizację transkryptu  $\beta$ -kateniny (**Tablica 7 E i F**).

W kontrolnej wątrobie obserwowano głównie jądrową ekspresję mRNA  $\beta$ -kateniny obecną zarówno w hepatocytach, jak i komórkach nabłonka przewodów żółciowych międzyczaszczkowych (**Tablica 7 G i H**).

Nasilenie reakcji hybrydocytochemicznej nie podlegało porównawczej analizie ilościowej.

## Tablica 7.

### Hybrydocytochemiczna lokalizacja $\beta$ -kateniny w wątrobie pacjentów z badanych grup.

Technika hybrydyzacji *in situ*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20  $\mu$ m.

Fragmety biopłatów wątroby pacjentów z grupy badanej (pzw C) (**A-D**); fragmety wątroby pobranej okołoperacyjnie u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym (HCC) (**E-F**) i wątroba kontrolna (**G, H**).

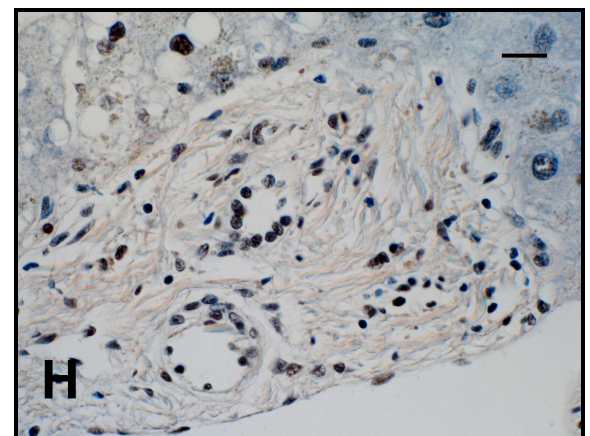
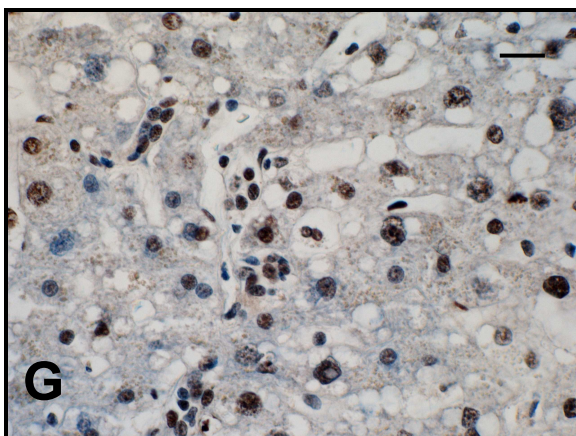
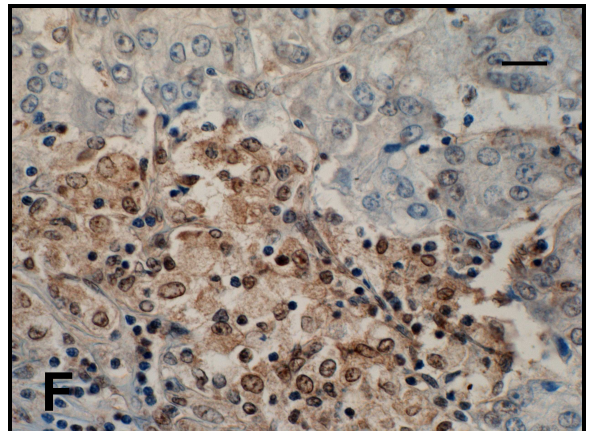
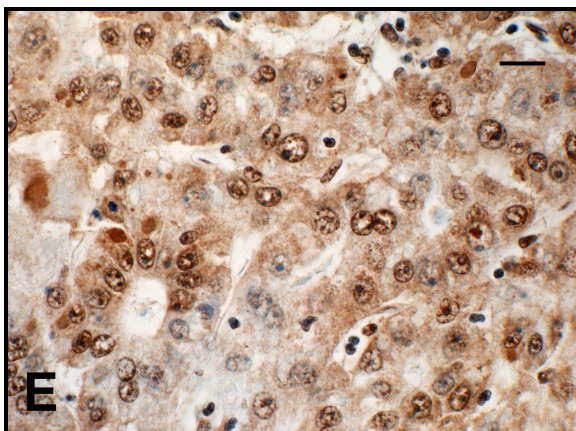
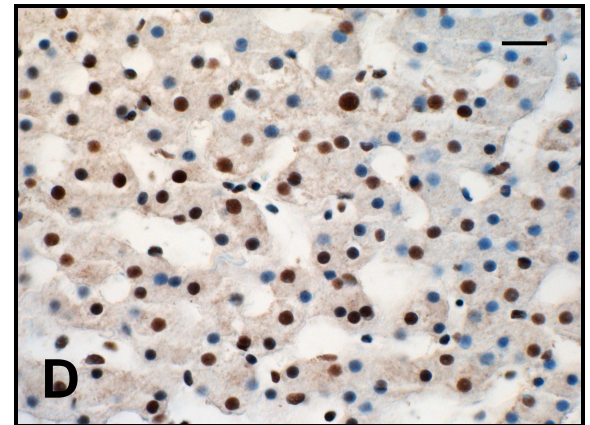
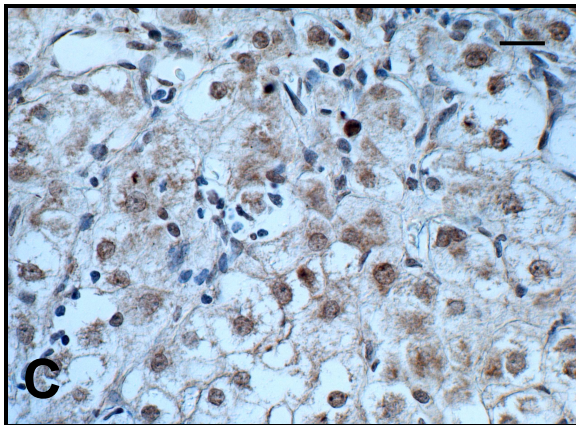
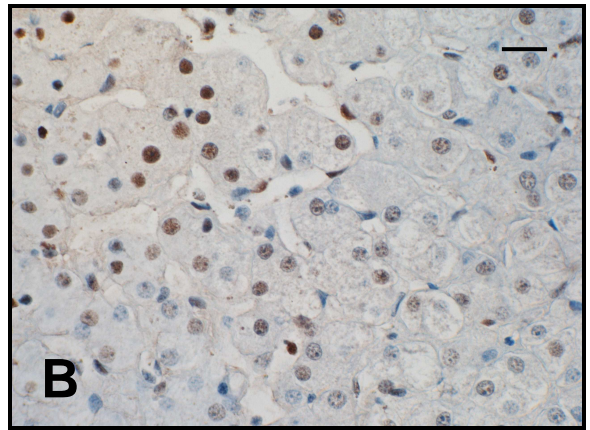
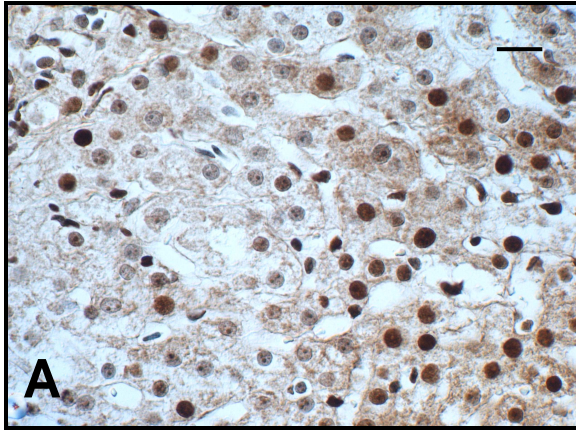
Jądrowo-cytoplazmatyczny wzór reakcji hybrydocytochemicznej na mRNA  $\beta$ -kateniny w licznych hepatocytach (**A, C**); jądrowa lokalizacja mRNA  $\beta$ -kateniny w mniejszej liczbie komórek (**B**) i licznych hepatocytach z pzw C (**D**).

Hybrydocytochemiczna lokalizacja mRNA  $\beta$ -kateniny w cytoplazmie i jądrach komórek zmienionych neoplastycznie (**E, F**).

W wątrobie kontrolnej pozytywną i intensywną reakcję na mRNA  $\beta$ -kateniny obserwowano w jądrach hepatocytów (**G**) oraz cholangiocytołów (**H**).

*A – pacjent nr 56 z pzw C; B – pacjentka nr 61 z pzw C; C - pacjent nr 48 z pzw C i marskością wątroby; D - pacjent nr 39 z pzw C; E, F – pacjent nr 55 z HCC (grade 1); G, H – pacjent kontrolny nr 8.*

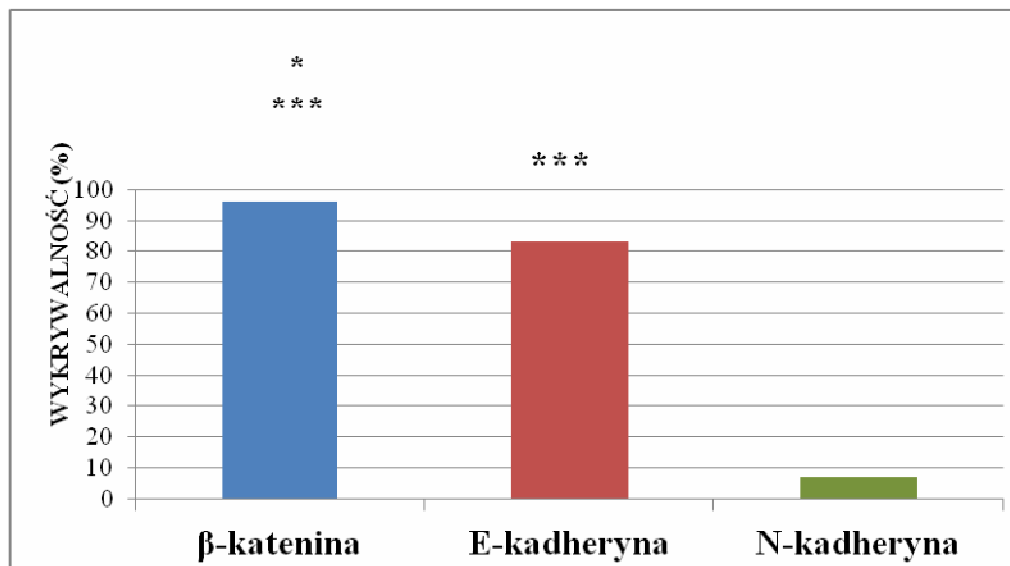




## 5. Analiza porównawcza wykrywalności (częstości występowania) białek adhezyjnych w obrębie poszczególnych grup pacjentów

### 5.1. Grupa z pzw C

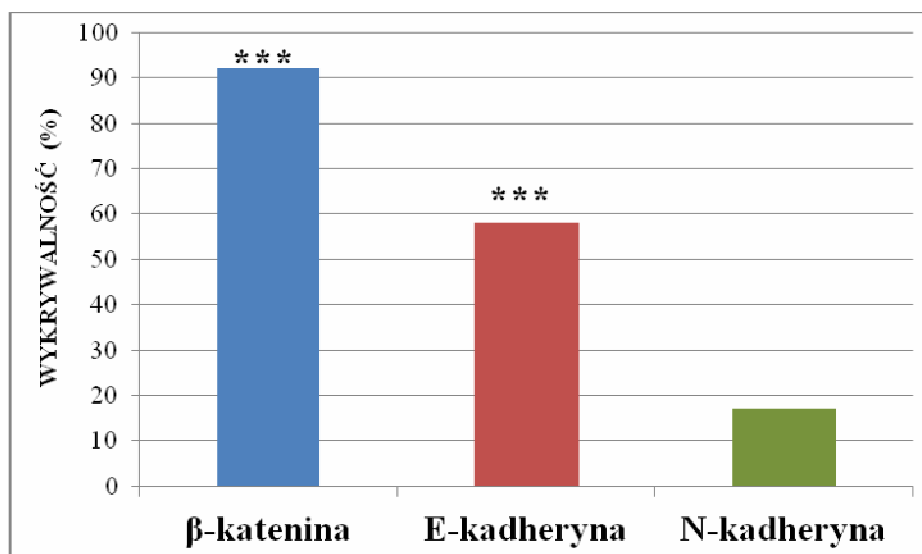
U chorych z pzw C wykrywano najczęściej  $\beta$ -kateninę (96%), kolejno E-kadherynę (83%) oraz najrzadziej N-kadherynę (7% pozytywnych przypadków) (**Rycina 12**). Różnice znamienne w wykrywalności zanotowano pomiędzy występowaniem  $\beta$ -kateniny i obu kadheryn: E-kadheryny oraz N-kadheryny ( $p < 0,05$  w obu przypadkach). Z obu kadheryn również częściej wykrywano E-kadherynę niż N-kadherynę w biopsatach wątroby tej grupy pacjentów (**Rycina 12**).



**Rycina 12.** Porównanie częstości występowania (wykrywalność)  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny w obrębie grupy pacjentów z pzw C; \*-  $p < 0,05$ ; \*\*\*-  $p < 0,001$ .

### 5.2. Grupa HCC

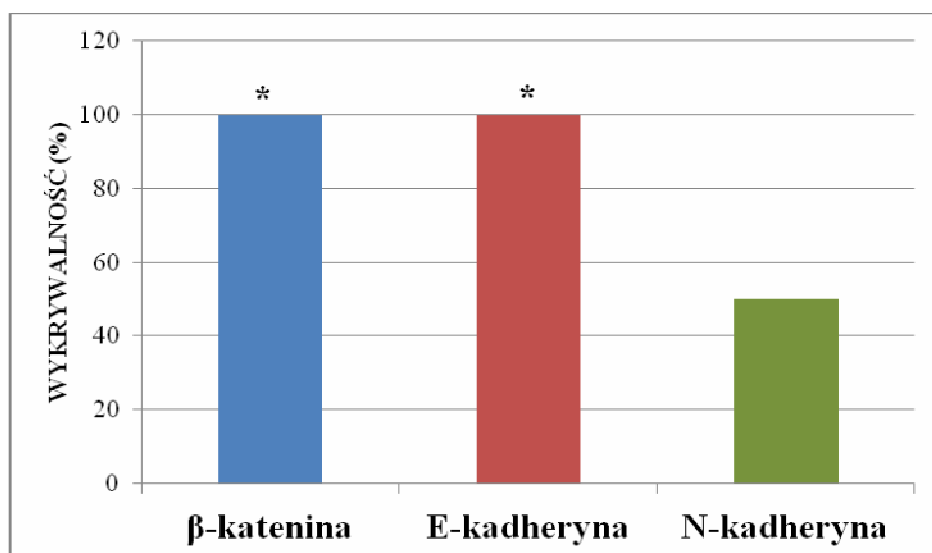
Podobnie jak w pzw C, także w wątrobie z rakiem wątroby największa była wykrywalność  $\beta$ -kateniny i to zarówno w porównaniu z częstością występowania pozytywnego sygnału na E-kadherynę, jak i N-kadherynę w biopsatach wątroby ( $p < 0,001$  w obu przypadkach). Z obu badanych kadheryn, również znamienne więcej pozytywnych przypadków dotyczyło E-kadheryny niż N-kadheryny ( $p < 0,001$ ) (**Rycina 13**).



**Rycina 13.** Porównanie częstości występowania (wykrywalność)  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny w obrębie grupy pacjentów z HCC; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

### 5.3. Kontrola

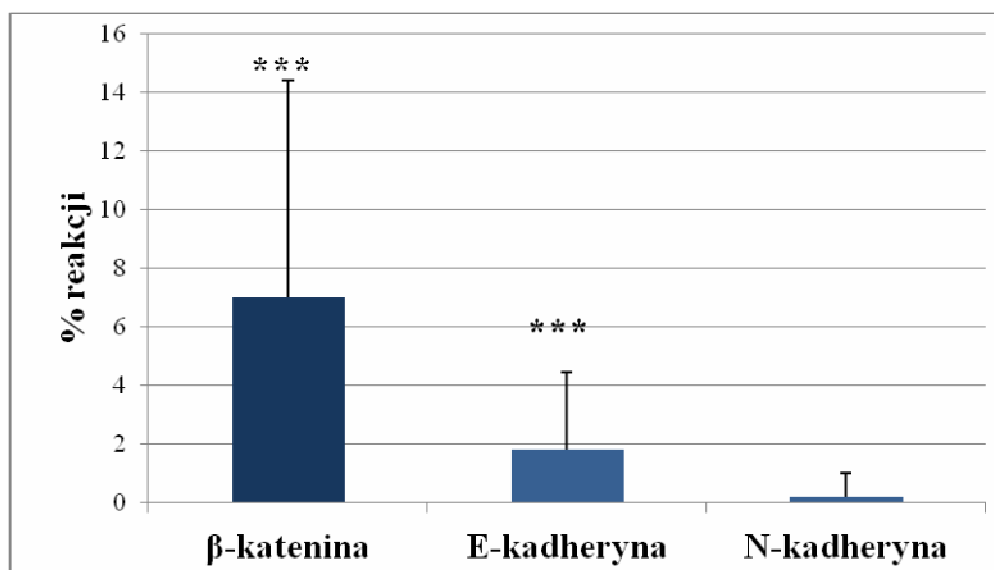
W tej grupie występowanie pozytywnej reakcji IHC na  $\beta$ -kateninę i E-kadherynę dotyczyło wszystkich badanych fragmentów zdrowej wątroby (100%). Nie różniły się więc te dwa parametry między sobą. Natomiast wykrywalność obu tych białek ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna) była większa niż N-kadheryny ( $p < 0,05$  w obu przypadkach) (**Rycina 14**).



**Rycina 14.** Porównanie częstości występowania (wykrywalność)  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny w kontroli; \* -  $p < 0,05$ .

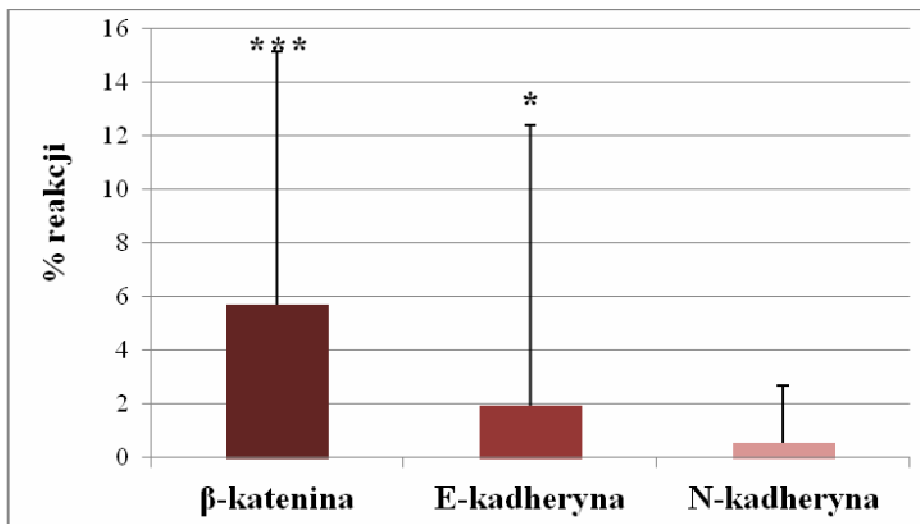
## 6. Analiza morfometryczna nasilenia ekspresji białek adhezyjnych w obrębie poszczególnych grup pacjentów

U chorych z pzw C porównując ekspresję tkankową (wyrażoną w % reakcji) wszystkich trzech białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna i N-kadheryna) wykazano istotnie większą ekspresję  $\beta$ -kateniny zarówno w porównaniu z ekspresją E-kadheryny, jak i N-kadheryny ( $p < 0,001$  w obu przypadkach). Z obu kadheryn dominowała ekspresja E-kadheryny nad ekspresją N-kadheryny ( $p < 0,001$ ) (Tabela 11; Rycina 15).



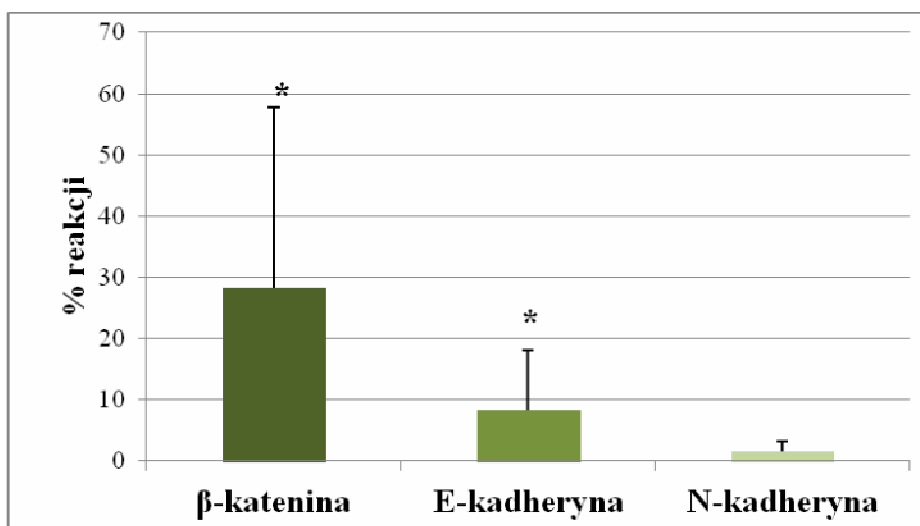
**Rycina 15.** Porównanie tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny oraz N-kadheryny u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV (test Wilcoxon); \*\*\* -  $p < 0,001$ .

W obrębie grupy HCC test Wilcoxon pozwolił na wykazanie znamienych różnic pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny zarówno w porównaniu z ekspresją E-kadheryny, jak i N-kadheryny ( $p < 0,001$  w obu przypadkach). Porównanie ekspresji obu kadheryn wykazało większą ekspresję E-kadheryny w porównaniu z ekspresją N-kadheryny ( $p = 0,05$ , na granicy istotności) (Tabela 11; Rycina 16).



**Rycina 16.** Porównanie tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny oraz N-kadheryny w pierwotnym raku wątroby (HCC) (test Wilcoxona); \* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

W grupie kontrolnej wykazano również większą ekspresję  $\beta$ -kateniny niż E-kadheryny, ale nie były to różnice statystycznie istotne. Natomiast istotnie większa okazała się ekspresja  $\beta$ -kateniny oraz E-kadheryny w porównaniu z ekspresją N-kadheryny ( $p < 0,05$  w obu przypadkach) (**Rycina 17, Tabela 11**).



**Rycina 17.** Porównanie tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny oraz N-kadheryny w kontroli (test Wilcoxona); \* -  $p < 0,05$ .

**Tabela 11.** Analiza porównawcza wzajemnej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (średni % reakcji $\pm$ SD) u chorych przewlekle zakażonych HCV, w raku wątrobowokomórkowym oraz w kontroli (test Wilcoxona).

Grupa	$\beta$ -katenina		E-kadheryna		p1	N-kadheryna		p2	p3
	n		n			n			
<b>pzw C</b>	54	7,00 $\pm$ 7,41	39	1,78 $\pm$ 2,67	<0,001	28	0,19 $\pm$ 0,78	<0,001	<0,001
<b>HCC</b>	61	5,71 $\pm$ 9,44	60	1,95 $\pm$ 10,49	<0,001	59	0,55 $\pm$ 2,16	<0,001	0,05
<b>kontrola</b>	6	28,24 $\pm$ 29,53	8	8,28 $\pm$ 9,78	0,129	6	1,62 $\pm$ 1,59	0,013	0,018

*Objaśnienia:* n – liczba osób w grupie; SD – odchylenie standardowe; p1 – poziom istotności pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny; p2 - poziom istotności pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i N-kadheryny; p3- poziom istotności pomiędzy ekspresją E-kadheryny i N-kadheryny.

#### **7. Analiza ekspresji białek adhezyjnych w grupie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*) oraz zaawansowania włóknienia (*staging*)**

W grupie badanej nie wykazano znamienych różnic w ekspresji białek w różnie zaawansowanych zmianach histopatologicznych (*grading* i *staging*) ( $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach, test Kruskala-Wallisa i Manna-Whitneya) (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Porównanie tkankowej ekspresji tkankowej  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (średni % reakcji $\pm$ SD) w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*) i stopnia zaawansowania włóknienia (*staging*) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV.

		n	$\beta$ -katenina	N	E-kadheryna	n	N-kadheryna
<b>Grading</b> (G)*	1	22	6,99 $\pm$ 6,65	18	1,73 $\pm$ 2,97	14	0,10 $\pm$ 0,36
	2	21	6,45 $\pm$ 6,67	18	1,55 $\pm$ 2,04	12	0,33 $\pm$ 1,13
	3	11	8,05 $\pm$ 10,34	5	2,77 $\pm$ 3,83	2	_*
<b>Staging</b> (S)*	0	2	*_	1	_*	1	_*
	1	28	7,83 $\pm$ 7,39	23	2,08 $\pm$ 2,98	17	0,08 $\pm$ 0,33
	2	13	5,34 $\pm$ 4,14	10	1,01 $\pm$ 1,16	7	0,56 $\pm$ 1,48
	3	6	3,85 $\pm$ 4,52	5	1,28 $\pm$ 2,15	2	_*
	4	5	12,90 $\pm$ 13,78	2	_*	1	_*

**Objaśnienia:** \* - parametry ocenione w półilościowej skali numerycznej (p. *Materiał i Metody*), n – liczba badanych osób; \*\_- zbyt mała liczebność grupy do wnioskowania statystycznego; p=0,940 dla ekspresji N-kadheryny między G1 i G2 (test Manna-Whitneya); p=0,842 dla ekspresji  $\beta$ -kateniny i p=0,702 dla ekspresji E-kadheryny pomiędzy G1, G2 i G3 (test Kruskala-Wallis).

W przypadku ekspresji  $\beta$ -kateniny w zależności od staging 1 (S1), S2, S3, S4 – p=0,473; dla ekspresji E-kadheryny w zależności od S1, S2 i S3 – p=0,795 (test Kruskala-Wallis); dla ekspresji N-kadheryny w S1 i S2 – p=0,756 (test Manna-Whitneya).

## 8. Porównanie ekspresji białek adhezyjnych u pacjentów z marskością i bez marskości wątroby

Statystyczna analiza porównawcza nasilenia ekspresji białek adhezyjnych u pacjentów z już rozwiniętą marskością wątroby i bez niej, była możliwa jedynie w odniesieniu do  $\beta$ -kateniny. Nie obserwowano istotnych różnic w porównywanych grupach chorych (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Porównanie ekspresji białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV i marskością wątroby oraz bez cech marskości wątroby.

Białko adhezyjne	Marskość wątroby	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD	P
$\beta$ -katenina	TAK	5	12,90	7,35	0,50	28,75	13,78	0,542
	NIE	49	6,39	3,40	0,00	24,96	6,38	
E-kadheryna	TAK	2	4,22	4,22	0,00	8,44	5,97	*-
	NIE	39	1,65	0,42	0,00	8,61	2,50	
N-kadheryna	TAK	1	0,00	0,00	0,00	0,00	-	*-
	NIE	27	0,20	0,00	0,00	3,92	0,79	

**Objaśnienia:** n – liczba badanych osób; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności (test Manna-Whitneya); \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego.

Podobnie jak u pacjentów z pzw C, również w grupie HCC nie wykazano istotnych różnic w ekspresji badanych białek adhezyjnych w zależności od stopnia złośliwości histologicznej badanych nowotworów pierwotnych wątroby (*GRADE*) ( $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach) (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Porównanie tkankowej ekspresji tkankowej  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (średni % reakcji $\pm$ SD) w zależności od złośliwości histologicznej HCC (*GRADE*).

<i>GRADE</i>	(G)*	n	$\beta$ -katenina	N	E-kadheryna	n	N-kadheryna
		1	8	5,63 $\pm$ 8,56	7	0,60 $\pm$ 1,23	7
2	41	6,04 $\pm$ 10,06	41	0,78 $\pm$ 3,43	41	0,39 $\pm$ 1,36	
3	11	4,04 $\pm$ 8,48	11	0,16 $\pm$ 0,48	11	1,30 $\pm$ 4,33	

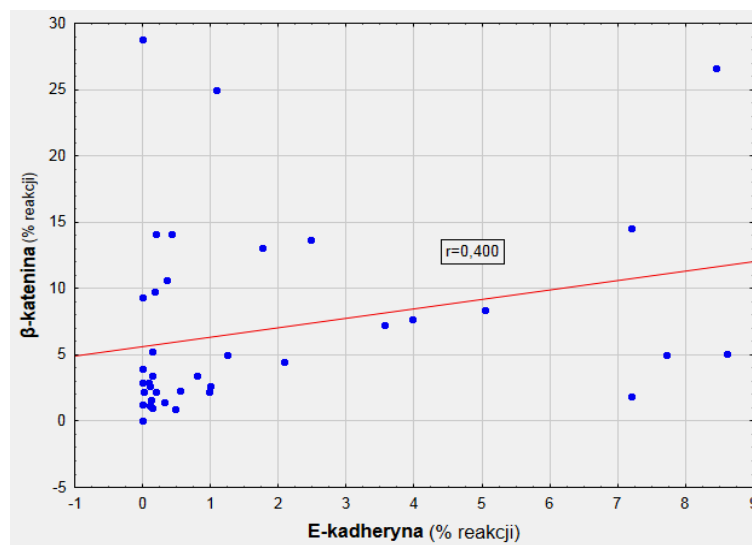
**Objaśnienia:** \* - parametry ocenione w półilościowej skali numerycznej (p. *Materiał i Metody*), n – liczba badanych osób;  $p = 0,570$  dla ekspresji  $\beta$ -kateniny między G1, G2 i G3;  $p = 0,324$  dla ekspresji E-kadheryny;  $p = 0,664$  dla ekspresji N-kadheryny (test Kruskala-Wallis).



Nie odnotowano różnic w ekspresji badanych białek adhezyjnych w HCC w zależności od wieku i płci chorych ( $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach, test Manna-Whitneya).

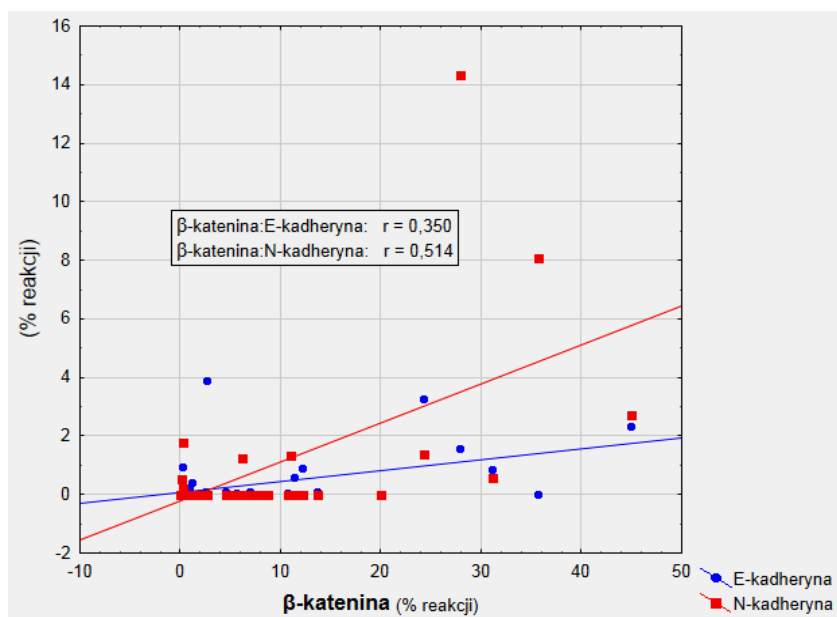
### 9. Korelacje między wzajemną ekspresją białek adhezyjnych w badanych grupach

W pzw C wykazano słabą pozytywną korelację Spearmana pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny ( $r=0,400$ ;  $p=0,01$ ) (**Rycina 18**). Pomędzy ekspresją pozostałych białek adhezyjnych nie obserwowano znamienych zależności ( $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach) (**Tabela 15**).



**Rycina 18.** Pozytywna korelacja porządku rang Spearmana pomiędzy wzajemną ekspresją  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV ( $p < 0,05$ ).

W grupie HCC odnotowano pozytywne korelacje Spearmana pomiędzy wzajemną ekspresją wszystkich białek adhezyjnych, tj.  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny ( $r=0,514$ ;  $p < 0,001$ ) oraz N-kadheryny ( $r=0,350$ ;  $p=0,01$ ) (**Rycina 19**) oraz wzajemną ekspresją obu kadheryn ( $r=0,410$ ;  $p=0,001$ ) (**Tabela 15**).



**Rycina 19.** Pozytywne korelacje porządku rang Spearmana pomiędzy wzajemną ekspresją  $\beta$ -kateniny i obu kadheryn (E- i N-kadheryna) w wątrobie pacjentów z pierwotnym rakiem wątroby ( $p < 0,05$ ).

W grupie kontrolnej (zdrowa wątroba) również obserwowano zależności pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i N-kadheryny oraz obu kadheryn, natomiast korelacja pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny pomimo wysokiej wartości współczynnika korelacji Spearmana ( $r = 0,743$ ), nie osiągnęła istotności statystycznej ( $p = 0,07$ ) (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy wzajemną wątrobową ekspresją  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole mięszu wątroby) w badanych grupach.

<b>pzw C</b>	n	r	p
$\beta$ -katenina i E-kadheryna	39	0,400	0,012
$\beta$ -katenina i N-kadheryna	25	-0,065	0,756
E-kadheryna i N-kadheryna	27	0,229	0,251

<b>HCC</b>	n	r	p
$\beta$ -katenina i E-kadheryna	60	0,514	<0,001
$\beta$ -katenina i N-kadheryna	59	0,350	0,006
E-kadheryna i N-kadheryna	59	0,410	0,001

<b>Kontrola</b>	n	r	p
$\beta$ -katenina i E-kadheryna	7	0,743	0,071
$\beta$ -katenina i N-kadheryna	8	0,761	0,028
E-kadheryna i N-kadheryna	7	0,867	0,012

*Objaśnienia:* n – liczba pacjentów; r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p – poziom istotności.

## **10. Tkankowa ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) w zależności od komórkowej lokalizacji**

### **4.10.1. $\beta$ -katenina**

Ekspresja  $\beta$ -kateniny zlokalizowana w błonach komórkowych (ekspresja błonowa/przeważająco błonowa) (zakodowana numerem 1 w Tabeli 16) wynosiła w wątrobie kontrolnej  $22,15 \pm 22,12\%$  i była wyższa od ekspresji o charakterze błonowym w pozostałych badanych grupach pacjentów, tj. pzw C ( $6,81 \pm 8,08$ ) i HCC ( $6,78 \pm 11,19$ ) (test Kruskala-Wallisa;  $p=0,06$ , na granicy istotności).

Ekspresję o lokalizacji cytoplazmatycznej (określonej numerem 2 w Tabeli 16) udało się statystycznie porównać jedynie pomiędzy grupą z pzw C oraz HCC. Wykazano, że jest ona

znamiennie wyższa u pacjentów z pzw C ( $6,43 \pm 5,44\%$ ) niż w HCC ( $2,78 \pm 3,78\%$ ) (test Manna-Whitneya;  $p=0,03$ ).

Ekspresję określoną jako mieszaną (zakodowaną pod numerem 3) wykazano w porównywalnym stopniu nasilenia w obu grupach, tj. pzw C ( $9,32 \pm 9,73\%$ ) oraz pierwotnym raku wątroby ( $6,85 \pm 7,22$ ) ( $p=0,574$ ) (**Tabela 16**).

Ze względu na zbyt małą liczebność jednej z porównywanych grup, nie udało się porównać statystycznie cytoplazmatycznej (zakodowanej pod numerem 2) oraz mieszanej (błonowo-cytoplazmatycznej; numer 3) ekspresji  $\beta$ -kateniny w badanych grupach (**Tabela 16**).

Nie znaleziono istotnych różnic ilościowych porównując ekspresję każdej z form komórkowej lokalizacji (1, 2 i 3) w obrębie możliwych do zanalizowania grup pacjentów, tj. z pzw C i rakiem wątrobowokomórkowym (HCC) ( $p>0,05$  w obu badanych grupach).

**Tabela 16.** Porównanie tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny (% reakcji na pole mięszu wątroby) w zależności od komórkowej lokalizacji badanych białek adhezyjnych.

	Lokalizacja	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD	p
<b>pzw C</b>	1	15	6,81	2,66	0,44	26,63	8,08	0,736
	2	24	6,43	4,50	0,34	18,75	5,44	
	3	13	9,32	4,96	0,95	28,75	9,73	
<b>HCC</b>	1	36	6,78	1,40	0,02	44,95	11,19	0,440
	2	8	2,78	1,38	0,04	11,33	3,78	
	3	12	6,85	4,59	0,02	24,23	7,22	
<b>Kontrola</b>	1	6	22,15	19,80	0,83	55,70	22,12	-*
	2	2	35,04	35,04	0,43	69,64	48,94	
	3	0	-	-	-	-	-	

**Objaśnienia:** n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności (test Kruskalla-Wallis); \*- za małą liczebność porównywanych grup do wnioskowania statystycznego; 1 – lokalizacja błonowa lub w przewodzie błonowa; 2 - lokalizacja cytoplazmatyczna; 3 - lokalizacja mieszaną (błonowo-cytoplazmatyczna);  $p=0,06$  pomiędzy lokalizacją 1 we wszystkich grupach;  $p=0,033$  dla lokalizacji 2 pomiędzy grupami;  $p=0,574$  dla lokalizacji 3 pomiędzy grupami (test Manna-Whitneya).

### 10.2. E-kadheryna

Z użyciem testu Kruskala-Wallisa wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji E-kadheryny o błonowej lokalizacji (zakodowanej numerem 1 w Tabeli 17) pomiędzy badanymi grupami pacjentów ( $p < 0,05$ ) (Tabela 17). Test wielokrotnych porównań szczegółowiej wykazał, iż istotnie większa była ekspresja E-kadheryny w kontroli ( $9,67 \pm 10,86\%$ ) w porównaniu z ekspresją w grupie HCC ( $1,32 \pm 4,21\%$ ), a także ekspresja błonowa E-kadheryny w wątrobie z pzw C ( $1,50 \pm 2,21\%$ ) w porównaniu z ekspresją w pierwotnym raku wątroby ( $1,32 \pm 4,21\%$ ) ( $p < 0,05$  w obu przypadkach). Nie było różnic w zakresie cytoplazmatycznej ekspresji białka (zakodowanej numerem 2) pomiędzy grupami ( $p < 0,05$ ). Ekspresja mieszana (błonowo-cytoplazmatyczna) występowała w zbyt małej liczbie przypadków, aby możliwe było porównanie wyników (Tabela 17). Nie znaleziono istotnych różnic ilościowych porównując każdą z form komórkowej lokalizacji (1, 2 i 3) w obrębie badanych grup, tj. pzw C, HCC, jak i kontroli ( $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach).

**Tabela 17.** Porównanie tkankowej ekspresji **E-kadheryny** (% reakcji na pole mięszu wątroby) w zależności od komórkowej lokalizacji badanych białek adhezyjnych.

	<b>Lokalizacja</b>	<b>n</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min.</b>	<b>Maks.</b>	<b>SD</b>	<b>p</b>
<b>pzw C</b>	1	19	1,50	0,35	0,01	7,20	2,21	0,136
	2	6	1,79	0,80	0,18	7,20	2,68	
	3	9	3,74	2,09	0,12	8,61	3,59	
<b>HCC</b>	1	27	1,32	0,09	0,00	21,74	4,21	-*
	2	5	15,83	0,11	0,01	78,80	35,20	
	3	3	0,61	0,86	0,02	0,95	0,51	
<b>Kontrola</b>	1	6	9,67	6,29	0,03	24,73	10,86	-*
	2	0	-	-	-	-	-	
	3	1	8,23	8,23	8,23	8,23		

**Objaśnienia:** n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności (test Kruskala-Wallisa); \*- za małą liczebność porównywanych grup do wnioskowania statystycznego; 1 - lokalizacja błonowa i w przewodzie błonowa; 2 - lokalizacja cytoplazmatyczna; 3 - lokalizacja mieszana (błonowo-cytoplazmatyczna);  $p = 0,007$  dla lokalizacji 1 pomiędzy grupami (test Kruskala-Wallisa); dodatkowo  $p = 0,03$  między kontrolą i HCC oraz  $p = 0,04$  między pzw C i HCC (test wielokrotnych porównań);  $p = 0,13$  dla lokalizacji 2 pomiędzy grupami (test Manna Whitneya).

### 10.3. N-kadheryna

W przypadku ekspresji tego białka ze względu na małą liczbę przypadków chorych z pozytywną reakcją immunocytochemiczną o określonej lokalizacji (błonowa, cytoplazmatyczna, mieszana) niemożliwe było porównanie ilościowe tej cechy statystycznej (Tabela 18).

**Tabela 18.** Porównanie tkankowej ekspresji N-kadheryny (% reakcji na pole miąższu wątroby) w zależności od komórkowej lokalizacji badanych białek adhezyjnych.

	Lokalizacja	n	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD	p
pzw C	1	0	-	-	-	-	-	* <sub>-</sub>
	2	2	2,64	2,64	1,36	3,92	1,81	
	3	0	-	-	-	-	-	
HCC	1	4	3,00	1,68	0,55	8,11	3,56	* <sub>-</sub>
	2	0	-	-	-	-	-	
	3	6	3,39	1,37	0,23	14,35	5,39	
Kontrola	1	4	2,43	2,15	1,38	4,04	1,25	* <sub>-</sub>
	2	0	-	-	-	-	-	
	3	0	-	-	-	-	-	

**Objaśnienia:** n – liczba pacjentów; SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności (test Kruskala-Wallis); \*<sub>-</sub> za małą liczebność porównywanych grup do wnioskowania statystycznego; 1 – lokalizacja błonowa i w przewodzie błonowa; 2 - lokalizacja cytoplazmatyczna; 3 - lokalizacja mieszana (błonowo-cytoplazmatyczna).

### 11. Tkankowa ekspresja białek adhezyjnych (β-ksenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych

Nie obserwowano istotnych statystycznie zależności pomiędzy tkankową ekspresją badanych białek adhezyjnych a danymi klinicznymi pacjentów z pzw C. Wartości wątrobowego wskaźnika E-kadheryna/β-ksenina również nie były skorelowane z danymi klinicznymi w grupie pacjentów z pzw C (Tabela 19).

**Tabela 19.** Wartości współczynnika korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny (% reakcji na pole miększu wątroby) oraz wskaźnika E-kadheryna/ $\beta$ -katenina, danymi kliniczno-laboratoryjnymi i histologicznymi u pacjentów z pzw C.

Cecha statystyczna	$\beta$ -katenina	E-kadheryna	N-kadheryna	E-kadheryna/ $\beta$ -katenina
wiek (lata)	0,004	0,086	-0,162	0,026
Czas trwania zakażenia (lata)	0,122	0,194	**_	0,373
BMI	-0,055	0,210	-0,075	0,331
<i>Grading*</i>	-0,080	0,096	-0,010	0,002
<i>Staging*</i>	-0,004	-0,003	0,067	0,047
stłuszczenie (%)	-0,028	0,015	0,100	-0,038
ALT (U/l)	-0,015	0,246	0,210	0,033
AST (U/l)	0,004	0,257	0,176	0,098
AFP (ng/ml)	0,173	0,202	-0,034	0,122
HCV RNA (IU/ml)	0,037	0,134	-0,228	0,084
białko całk. (g/dl)	0,067	-0,035	0,216	0,021
albuminy (g/dl)	0,052	-0,010	0,063	0,042
Gamma-globuliny (g/dl)	-0,010	-0,015	0,166	-0,113
Płytki krwi (G/l)	0,218	0,050	-0,065	0,041
Cholesterol (mg/dl)	0,014	0,003	0,015	-0,043
GGTP (U/l)	0,007	0,273	0,123	0,067

**Objaśnienia:** \* - parametry ocenione w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); \*\*\_- za małą liczebność porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

## Tablica 8.

### Immunocytochemiczna lokalizacja markerów proliferacji komórkowej (antygen Ki-67 i cyklina D1) w wątrobie pacjentów z badanych grup.

Technika immunocytochemiczna w oparciu o system detekcyjny *new polimer-based IHC*. Podbarwienie hematoksyliną. Kontrast interferencyjny Nomarskiego. Skala = 20 µm.

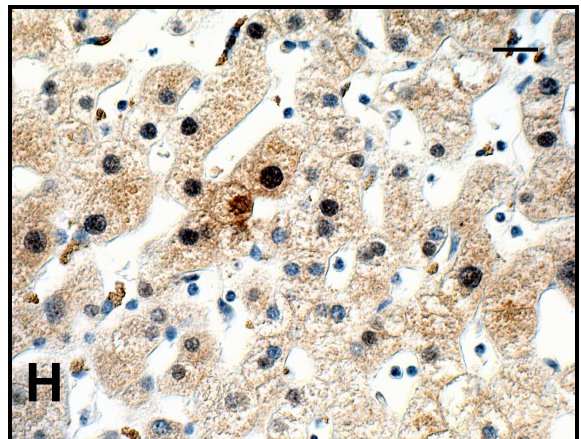
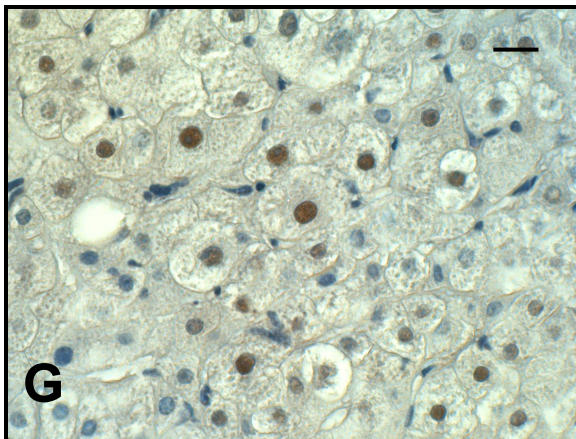
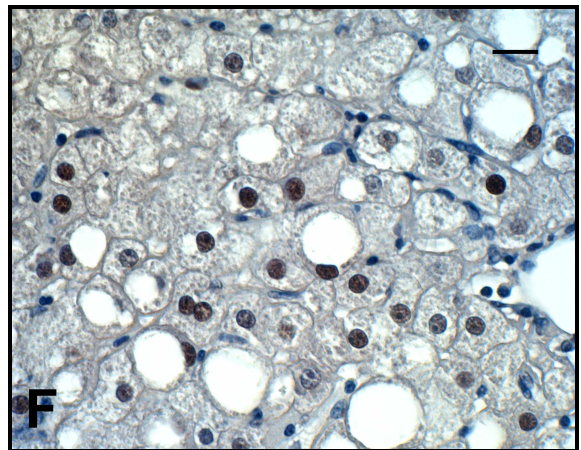
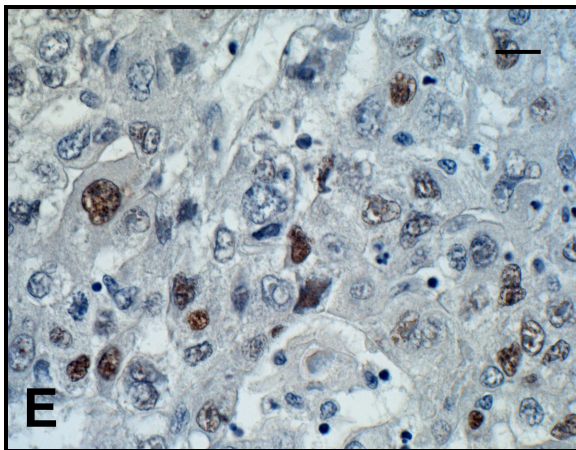
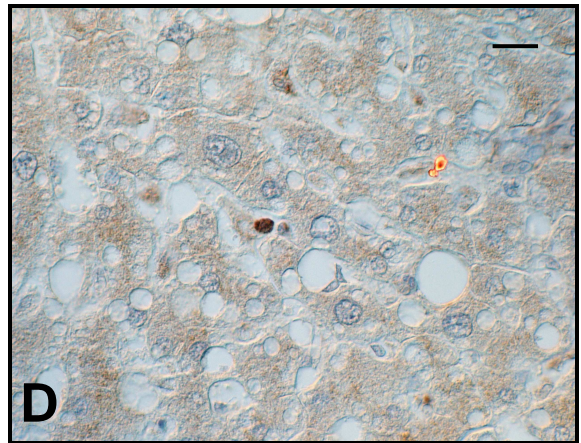
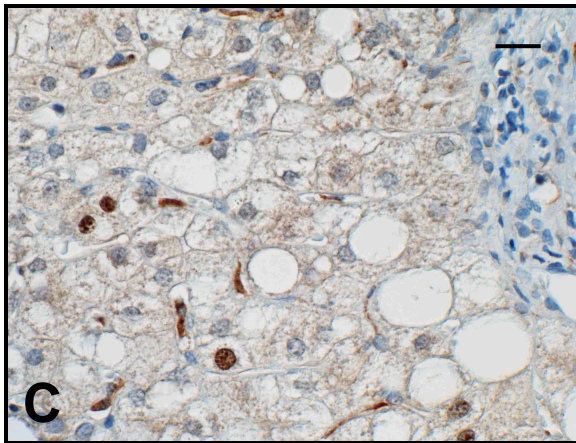
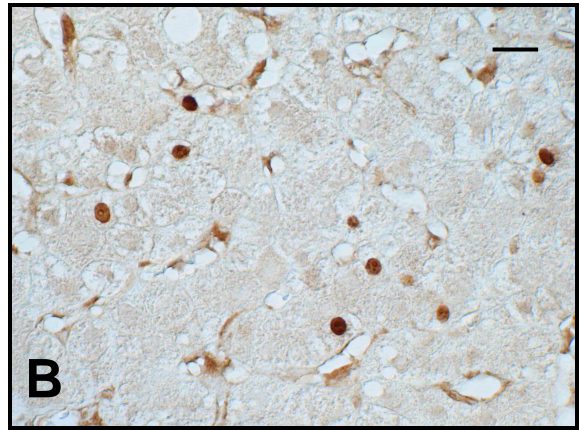
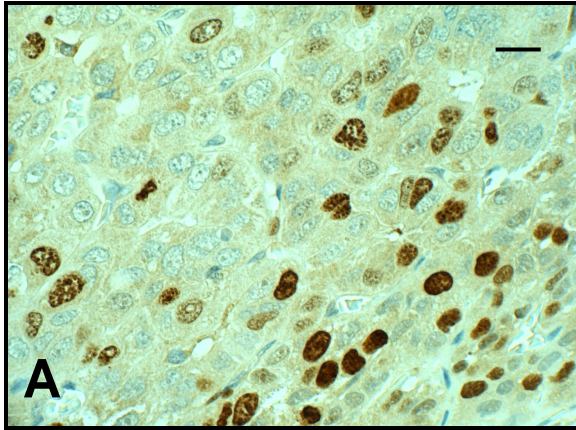
Fragmety wątroby pacjentów z grupy HCC (**A, E**), z grupy z pzw C (**B, C, F, G**) i kontroli (**D, H**).

Obserwowano wyłącznie jądrowy wzór reakcji IHC na antygen Ki-67 w licznych neoplastycznie zmienionych komórkach wątroby (**A**); silna pozytywna reakcja IHC na Ki-67 w jądrach hepatocytów u pacjentów z pzw C i marskością wątroby (**B, C**); obecność pojedynczych Ki-67-immunopozytywnych jąder komórkowych w wątrobie kontrolnej (**D**).

Ekspresja cykliny D1 w licznych pleomorficznych jądrach transformowanych komórek HCC (**E**); Liczne immunopoztywne jądra komórkowe z lokalizacją cykliny D1 u pacjentów z grupy pzw C (**F, G**); ekspresja cykliny D1 w wątrobie kontrolnej (**H**).

*A – pacjent z HCC nr 61 (grade 2); B - pacjent z pzw C i marskością wątroby nr 50; C – pacjent z pzw C i marskością wątroby nr 44; D – pacjent kontrolny nr 8; E - pacjent z HCC nr 61 (grade 2); F – pacjentka z grupy z pzw C nr 1; G – pacjentka z grupy z pzw C nr 16; H – pacjent kontrolny nr 8.*





komórek nacieków zapalnych (głównie limfocyty) obecnych w przestrzeniach bramno-żółciowych lub wewnątrzrazikowo (**Tablica 8 B i C**). Obecność pojedynczych jąder z pozytywną reakcją na antygen Ki-67 obserwowano także w kontrolnej wątrobie (**Tablica 8 D**). Ki-67-pozytywne jądra komórkowe w wątrobie wykazano u 100% pacjentów z HCC, 74% chorych z pzw C i w 62% narządów kontrolnych.

Średnie nasilenie ekspresji (skala półilościowa) Ki-67 w pzw C wynosiło  $1,02 \pm 0,84$  (mediana 1,00), a w kontroli  $0,63 \pm 0,52$  (mediana 1,00) i nie były to różnice statystycznie istotne ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 21**).

**Tabela 21.** Ekspresja antygeny proliferacyjnego Ki-67 w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i w wątrobie kontrolnej.

	<b>n</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min.</b>	<b>Maks.</b>	<b>SD</b>
<b>pzw C</b>	54	1,02	1,00	0,00	3,00	0,84
<b>Kontrola</b>	8	0,63	1,00	0,00	1,00	0,52

**Objaśnienia:** *n* – liczba osób w grupie; *SD* – odchylenie standardowe; \* -  $p=0,276$  pomiędzy grupą pzw C i kontrolą.

U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV wykazano dość słabą negatywną korelację pomiędzy ekspresją E-kadheryny i ekspresją antygeny Ki-67 ( $r=-0,360$ ;  $p < 0,05$ ). Nie obserwowano żadnych istotnych zależności pomiędzy ekspresją pozostałych białek adhezyjnych z ekspresją antygeny proliferacyjnego w grupie z pzw C (**Tabela 22**).

W grupie kontrolnej nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy ekspresją białek adhezyjnych i ekspresją antygeny Ki-67 (**Tabela 22**).

**Tabela 22.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole miększu wątroby) i ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 w badanych grupach.

<b>pzw C</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
$\beta$ -katenina i Ki-67	47	-0,204	0,169
E-kadheryna i Ki-67	34	-0,360	0,040
N-kadheryna i Ki-67	28	-0,277	0,153

<b>Kontrola</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
$\beta$ -katenina i Ki-67	8	0,620	0,101
E-kadheryna i Ki-67	7	0,632	0,127
N-kadheryna i Ki-67	8	0,300	0,470

**Objaśnienia:** *n* – liczba pacjentów; *r* – współczynnik korelacji rang Spearmana; *p* – poziom istotności.

### **13. Korelacja ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67 z danymi klinicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z pzw C**

W grupie badanej wykazano słabe pozytywne korelacje z wiekiem pacjenta z pzw C, aktywnością zapalną w wątrobie (*grading*) oraz stopniem włóknienia (*staging*) i stłuszczenia narządu. Słabe negatywne korelacje obserwowano między ekspresją tkankową tego antygenu proliferacyjnego a długością zakażenia HCV oraz liczbą płytek krwi u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Nie wykazano zależności pomiędzy ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 a stężeniem AFP w surowicy krwi, aktywnością aminotransferaz (ALT, AST), ładunkiem wirusa czy pozostałymi wynikami badań pracownianych (**Tabela 23**).

**Tabela 23.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy tkankową ekspresją antygeny proliferacyjnego Ki-67 a danymi klinicznymi, histopatologicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.

<b>pzw C</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Ki-67 i wiek (lata)	54	0,387	0,004
Ki-67 i czas trwania zakażenia (lata)	29	-0,410	0,027
Ki-67 i BMI	42	0,188	0,234
Ki-67 i <i>grading</i>	54	0,329	0,015
Ki-67 i <i>staging</i>	54	0,351	0,009
Ki-67 i stłuszczenie %	54	0,388	0,004
Ki-67 i ALT (U/l)	52	0,006	0,968
Ki-67 i AST (U/l)	52	0,067	0,635
Ki-67 i AFP (ng/ml)	51	0,208	0,144
Ki-67 i HCV RNA (IU/ml)	51	0,158	0,268
Ki-67 i białko całkowite (g/dl)	52	-0,142	0,316
Ki-67 i albuminy (g/dl)	45	0,033	0,830
Ki-67 i gamma-globuliny (g/dl)	52	-0,080	0,571
Ki-67 i płytki krwi (G/l)	52	-0,330	0,017
Ki-67 i cholesterol (mg/dl)	45	-0,212	0,161
Ki-67 i GGTP (U/l)	41	0,233	0,142

**Objaśnienia:** *n* – liczba pacjentów; *r* – współczynnik korelacji rang Spearmana; *p* – poziom istotności.

#### **14. Ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a ekspresja cykliny D1 w wątrobie**

Ekspresję cykliny D1 oceniono w grupie z HCC (n=4), pzw C oraz w wątrobie kontrolnej. U pacjentów z HCC analizę ekspresji cykliny D1 wykonano, podobnie jak Ki-67 u czterech chorych, stąd też wyniki te nie podlegały analizie ilościowej i statystycznej. Ekspresja białka obecna była w licznych pleomorficznych jądrach komórkowych neoplastycznie zmienionych hepatocytów (**Tablica 8 E**).

Komórkowa lokalizacja cykliny D1 w grupie pzw C, podobnie jak antygeny Ki-67 dotyczyła jąder komórek wątrobowych (**Tablica 8 F i G**). Obecność tego białka wykazano w 32/51 (63%) badanych bioptatów wątroby z przewlekłym zakażeniem HCV oraz w 4/8 badanych narządów

kontrolnych. Natomiast średnie nasilenie ekspresji tego białka (skala półilościowa) w pzw C wynosiło  $1,16 \pm 1,05$  (mediana 1,00), a w kontroli  $0,05 \pm 0,53$  (mediana 0,50) i nie różniło się znacząco pomiędzy grupami ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 24**).

**Tabela 24.** Ekspresja cykliny D1 w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i w wątrobie kontrolnej.

	<b>n</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min.</b>	<b>Maks.</b>	<b>SD</b>
<b>pzw C</b>	51	1,16	1,00	0,00	3,00	1,05
<b>Kontrola</b>	8	0,50	0,50	0,00	1,00	0,53

**Objaśnienia:** *n* – liczba osób w grupie; *SD* – odchylenie standardowe; \* -  $p=0,126$  pomiędzy grupą pzw C i kontrolą.

Ani u pacjentów z pzw C, ani w kontroli nie obserwowano żadnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją białek adhezyjnych a ekspresją cykliny D1 (**Tabela 25**).

**Tabela 25.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole mięszu wątroby) i ekspresją cykliny D1 w badanych grupach.

<b>pzw C</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
$\beta$ -katenina i cyklina D1	44	-0,108	0,485
E-kadheryna i cyklina D1	32	-0,049	0,792
N-kadheryna i cyklina D1	25	-0,242	0,245

<b>Kontrola</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
$\beta$ -katenina i cyklina D1	8	0,436	0,280
E-kadheryna i cyklina D1	7	0,144	0,758
N-kadheryna i cyklina D1	8	-0,116	0,784

**Objaśnienia:** *n* – liczba pacjentów; *r* – współczynnik korelacji rang Spearmana; *p* – poziom istotności.

### 15. Korelacja ekspresji cykliny D1 z danymi klinicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z pzw C

W grupie badanej nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją cykliny D1 a danymi klinicznymi oraz wynikami badań pracownianych (**Tabela 26**).

**Tabela 26.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy tkankową ekspresją cykliny D1 a danymi klinicznymi, histopatologicznymi i wynikami badań pracownianych pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.

<b>pzw C</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Cyklina D1 i wiek (lata)	51	0,098	0,492
Cyklina D1 i czas trwania zakażenia (lata)	29	0,158	0,414
Cyklina D1 i BMI	40	-0,219	0,175
Cyklina D1 i <i>grading</i>	51	0,070	0,625
Cyklina D1 i <i>staging</i>	51	0,119	0,406
Cyklina D1 i stłuszczenie %	51	-0,248	0,079
Cyklina D1 i ALT (U/l)	49	-0,058	0,670
Cyklina D1 i AST (U/l)	49	0,047	0,748
Cyklina D1 i AFP (ng/ml)	48	0,106	0,475
Cyklina D1 i HCV RNA (IU/ml)	48	0,236	0,106
Cyklina D1 i białko całkowite (g/dl)	49	-0,130	0,372
Cyklina D1 i albuminy (g/dl)	43	0,164	0,293
Cyklina D1 i gamma-globuliny (g/dl)	49	-0,132	0,366
Cyklina D1 i płytki krwi (G/l)	49	0,108	0,459
Cyklina D1 i cholesterol (mg/dl)	42	0,169	0,285
Cyklina D1 i GGTP (U/l)	37	0,188	0,266

**Objaśnienia:** *n* – liczba pacjentów; *r* – współczynnik korelacji rang Spearmana; *p* – poziom istotności.

## 16. Ekspresja białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) a ekspresja wimentyny w wątrobie

Ekspresję białka wimentyny oceniono w wątrobie 30 pacjentów z pzw C oraz w wątrobie kontrolnej (n=8) (Tabela 27).

Białko to zlokalizowano w cytoplazmie nielicznych komórek zatok wątrobowych (komórki Browicza-Kupffera i śródbłónka naczyń). Nie obserwowano ekspresji tego białka w hepatocytach. Wykrywalność tego białka w biopatach wątroby z zakażeniem HCV wynosiła 17/30 pozytywnych przypadków (57%), a w grupie kontrolnej – 7/8 (88%).

Średnie nasilenie ekspresji tego białka w wątrobie z pzw C wynosiło  $0,63 \pm 0,61$  (mediana 1,00), a w kontroli  $0,88 \pm 0,35$  (mediana 1,00) i nie wykazano znamienych różnic pomiędzy grupami ( $p > 0,05$ ) (Tabela 27).

**Tabela 27.** Ekspresja wimentyny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i w wątrobie kontrolnej.

	<b>n</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Min.</b>	<b>Maks.</b>	<b>SD</b>
<b>pzw C</b>	30	0,63	1,00	0,00	2,00	0,61
<b>Kontrola</b>	8	0,88	1,00	0,00	1,00	0,35

**Objaśnienia:** n – liczba osób w grupie; SD – odchylenie standardowe; \* -  $p=0,297$  pomiędzy grupą pzw C i kontrolą.

Ani u pacjentów z pzw C, ani w kontroli nie obserwowano żadnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją białek adhezyjnych a ekspresją wimentyny (Tabela 28).

**Tabela 28.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny (% reakcji na pole mięszcu wątroby) i ekspresją wimentyny w badanych grupach.

<b>pzw C</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
$\beta$ -katenina i wimentyna	27	-0,060	0,768
E-kadheryna i wimentyna	28	-0,100	0,612
N-kadheryna i wimentyna	25	-0,319	0,120

<b>Kontrola</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
$\beta$ -katenina i wimentyna	8	-0,247	0,555
E-kadheryna i wimentyna	7	-0,612	0,144
N-kadheryna i wimentyna	8	-0,615	0,105

**Objaśnienia:** *n* – liczba pacjentów; *r* – współczynnik korelacji rang Spearmana; *p* – poziom istotności.

### **17. Korelacja ekspresji wimentyny z danymi klinicznymi i wynikami badań laboratoryjnych pacjentów z pzw C**

W grupie badanej nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją wimentyny a danymi klinicznymi oraz wynikami badań pracownianych (**Tabela 29**).



**Tabela 29.** Współczynniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy tkankową ekspresją wimentyny a danymi klinicznymi, histopatologicznymi i wynikami badań pracownianych pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.

<b>pzw C</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Wimentyna i wiek (lata)	30	0,141	0,456
Wimentyna i czas trwania zakażenia (lata)	17	-0,050	0,850
Wimentyna i BMI	30	0,119	0,531
Wimentyna i <i>grading</i>	30	0,206	0,274
Wimentyna i <i>staging</i>	30	-0,015	0,937
Wimentyna i stłuszczenie %	30	-0,073	0,702
Wimentyna i ALT (U/l)	30	0,258	0,168
Wimentyna i AST (U/l)	30	0,030	0,877
Wimentyna i AFP (ng/ml)	30	-0,219	0,246
Wimentyna i HCV RNA (IU/ml)	30	-0,088	0,644
Wimentyna i białko całkowite (g/dl)	30	-0,256	0,172
Wimentyna i albuminy (g/dl)	30	-0,195	0,301
Wimentyna i gamma-globuliny (g/dl)	30	-0,081	0,670
Wimentyna i płytki krwi (G/l)	30	-0,129	0,498
Wimentyna i cholesterol (mg/dl)	23	-0,079	0,719
Wimentyna i GGTP (U/l)	18	0,182	0,469

**Objaśnienia:** *n* – liczba pacjentów; *r* – współczynnik korelacji rang Spearmana; *p* – poziom istotności.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

### *Ekspresja $\beta$ -kateniny*

Ścieżka sygnałowa Wnt/Fzd/ $\beta$ -katenina odgrywa istotną rolę w fizjologii i patologii wątroby. Wykazano jej udział w rozwoju embrionalnym wątroby i morfogenezie dróg żółciowych. W życiu postnatalnym utrzymuje prawidłową homeostazę komórek wątrobowych<sup>226</sup>. Wpływa na formowanie struktury i aktywność metaboliczną gronka wątrobowego. Umożliwia wzrost i regenerację wątroby. Chroni wątrobę przed działaniem czynników toksycznych i oksydacyjnym stresem<sup>175</sup>. Z drogą sygnałową Wnt związane są patomechanizmy hepatokancerogenezy, dotyczące zarówno *hepatoblastoma*, jak i pierwotnego raka wątroby (HCC)<sup>226,227</sup>. Dokładne mechanizmy powstawania HCC z udziałem  $\beta$ -kateniny nie są jednak dokładnie poznane<sup>176,226,228</sup>.

W obecnej pracy analizie poddano bioptyaty wątroby oraz dane kliniczne pacjentów z długotrwałym przewlekłym zakażeniem HCV. Założenia pracy wynikały z opisów w piśmiennictwie o istotnym udziale szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w hepatokancerogenezie. Opisy zaburzeń tkankowej ekspresji kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina (ECCU) w pracach innych badaczy dotyczą głównie raka wątroby. Wraz z progresją chorób wątroby obserwowano obniżenie ekspresji E-kadheryny i nadekspresję  $\beta$ -kateniny z jej cytoplazmatyczną i/lub jądrową translokacją<sup>193</sup>. Nieprawidłowości funkcjonowania ECCU prowadziły do stopniowej utraty połączeń międzykomórkowych, progresji włóknienia wątroby, rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego<sup>193,209</sup>. Jednym z mechanizmów włóknienia wątroby jest wpływ białek szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina na komórki gwiazdziste wątroby (HSCs)<sup>211</sup>. Nasilenie transkrypcyjnej aktywności  $\beta$ -kateniny wiązano natomiast głównie z mutacjami genu  $\beta$ -kateniny (CTNNB1). Najnowsze badania z zastosowaniem metody NGS (ang. *next generation sequencing*) potwierdziły wcześniejsze obserwacje, iż gen CTNNB1 jest najczęstszym zmutowanym onkogenem w HCC<sup>229</sup>. Wysoką częstość występowania mutacji  $\beta$ -kateniny wykazywano w HCC na tle zakażenia HCV<sup>162,230,231,232</sup>. Ponadto więcej mutacji genowych tego białka wykazywano w HCC związanych z zakażeniem HCV niż HBV<sup>232,233,234</sup>. U pacjentów z południowych Włoch, mutacje CTNNB1 związane były dodatkowo z młodszym wiekiem pacjenta oraz mniej zróżnicowanym HCC<sup>234</sup>.

Badania w ramach obecnej pracy dotyczyły 63 pacjentów z pzw C, u których średni czas trwania zakażenia HCV wynosił 24±9 lat. W grupie tej wykazano ok. 2-krotnie podwyższone

aktywności aminotransferaz oraz GGTP. Średnia wartość stężenia AFP w surowicy krwi grupy badanej była natomiast w granicach normy. Ocena histopatologiczna wątroby u większości pacjentów (81%) wykazała minimalną i łagodną aktywność zapalną (*grading* 1 i 2). Umiarkowaną aktywność zapalną stwierdzono tylko w 19% (12/63) badanych bioptatów wątroby. Stopień zaawansowania włóknienia (*staging*) w skali numerycznej najczęściej oceniano jako 1. To minimalne włóknienie (S1) dotyczyło 55% chorych. Natomiast liczba pacjentów z marskością wątroby (*Staging* 4) stanowiła jedynie 10% całej grupy badanej. Ewidentne cechy stłuszczenia komórek wątrobowych obserwowano u około połowy chorych. Immunocytochemiczna analiza ekspresji  $\beta$ -kateniny wykazała obecność tego białka w większości (96%) badanych bioptatów wątroby pacjentów z pzw C. Obecność mRNA  $\beta$ -kateniny potwierdzono z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ*. Obserwowano zmianę normalnej tj. błonowej lokalizacji komórkowej białka (wykazanej w kontroli), na cytoplazmatyczny (44%) bądź mieszany (błonowo-cytoplazmatyczny) (25%) wzór ekspresji  $\beta$ -kateniny. Nie obserwowano reakcji jądrowej na to białko u żadnego z pacjentów z pzw C, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa<sup>235</sup>. Inni autorzy obserwowali akumulację  $\beta$ -kateniny zarówno u pacjentów z, jak i bez mutacji *CTNBI*, ale byli to wyłącznie pacjenci z już rozwiniętym HCC<sup>235</sup>. W obecnej pracy wykazano obecność mRNA  $\beta$ -kateniny w podobnych, jak samo białko komórkowych kompartmentach, tj. zarówno w cytoplazmie, jak i na błonach komórkowych. W pojedynczych przypadkach transkrypty  $\beta$ -kateniny widoczne były w jądrach komórkowych. Nie można porównać tych danych z wynikami innych autorów u pacjentów z pzw C, bo brakuje takich doniesień w piśmiennictwie. W przypadku raka wątroby niektórzy autorzy wykazali nadekspresję mRNA  $\beta$ -kateniny i TCF-4, ale nie GSK-3 $\beta$ . Obserwowano przy tym mutacje  $\beta$ -kateniny (ale nie pozostałych białek) u ok. 44% pacjentów<sup>169</sup>. Mutacje egzonu 3  $\beta$ -kateniny i nadekspresja tego białka były niezależnie skorelowane z nadekspresją genu c-Myc w HCC<sup>169</sup>. W niedawno opublikowanej pracy na populacji rosyjskiej, odsetek mutacji  $\beta$ -kateniny w HCC wynosił zaledwie 6,4% (dwóch pacjentów), a aksyny 1 – 9,7% (trzech chorych). U jednego pacjenta z HCC z mutacją genu *CTNBI* wykazano tło wirusowe HCC (HCV i HBV)<sup>236</sup>. W badaniach Herath i wsp. mutację genu  $\beta$ -kateniny wykazano tylko w jednym HCC wśród pacjentów pochodzących z Australii i Południowej Afryki i to bez zmian w ekspresji samego białka<sup>237</sup>.

Częstość wykrywania pozytywnej reakcji immunocytochemicznej (IHC) na  $\beta$ -kateninę u pacjentów z pzw C ocenianych w tej pracy była podobna jak w HCC (96% vs. 92%). Co zaskakujące w materiale z HCC dominował błonowy wzór reakcji IHC (64%), choć widoczne były również immunopoztywne komórki z cytoplazmatyczną (14%) i błonowo-cytoplazmatyczną lokalizacją sygnału (22%). Obecność jądrowej lokalizacji  $\beta$ -kateniny wykazano w nielicznych komórkach HCC i u pojedynczych chorych badanych w tej pracy.

Badania na poziomie mRNA (hybrydyzacja *in situ*) potwierdziły obecność transkryptu  $\beta$ -kateniny w wątrobie kontrolnej oraz w grupie z pzw C i HCC u tych pacjentów, którzy wykazywali pozytywną reakcję IHC na białko. Oprócz cytoplazmatycznej lokalizacji mRNA tego białka, we wszystkich badanych grupach wykazywano jednocześnie ekspresję w jądrach komórkowych. Wynik ten jest tylko częściowo zgodny z pracami grupy Cui i wsp., którzy z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* (egzon 3 genu), wykazali przede wszystkim silny cytoplazmatyczny sygnał na mRNA  $\beta$ -kateniny w komórkach HCC. Nadekspresja transkryptu  $\beta$ -kateniny była ponadto skorelowana z wysokim potencjałem przerzutowania w badanych rakach wątroby<sup>238,239</sup>. Inna praca tego zespołu potwierdza nadekspresję mRNA  $\beta$ -kateniny w HCC i jej korelację z nadekspresją genu c-Myc w rakach wątroby<sup>169</sup>. Ponadto, jak wykazano, nadekspresja  $\beta$ -kateniny towarzyszyła mutacjom genu (~44% chorych)<sup>169</sup>. Autorzy ci potwierdzają akumulację samego białka  $\beta$ -kateniny na terenie zarówno cytoplazmy, jak i jąder komórkowych patologicznie zmienionych komórek HCC<sup>169,238,239</sup>.

Wyniki cytoplazmatycznej lub mieszanej (błonowo-cytoplazmatycznej) lokalizacji komórkowej białka  $\beta$ -kateniny uzyskane w tej pracy, są natomiast zgodne z opisami uzyskanymi przez innych autorów, zwłaszcza opisujących duży odsetek z niejądrową ekspresją tego białka<sup>164,240,241</sup>. Biorąc pod uwagę lokalizację komórkową i nasilenie tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, w progresji nowotworów wątroby kluczowe wydaje się występowanie jądrowej lokalizacji białka, bądź niejądrowa lokalizacja, ale z nadekspresją  $\beta$ -kateniny<sup>164,242</sup>. Niejądrowy wzór ekspresji  $\beta$ -kateniny wraz z jej nadekspresją występował w guzach powyżej 5 cm średnicy, zbudowanych z komórek słabiej zróżnicowanych, u pacjentów z krótszym czasem przeżycia<sup>164</sup>. Grupa Joo i wsp. natomiast wykazała wyższy indeks mitotyczny w guzach wątroby z niejądrową lokalizacją i nadekspresją tego białka w HCC, ale także w HCC z jądrową lokalizacją  $\beta$ -kateniny. Przeważał niejądrowy wzór ekspresji (ok. 38% vs. 21% guzów). Nie udało się wykazać korelacji pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i cykliny D1, jak

wykazały to badania innych autorów<sup>242</sup>. Badacze ci dysponowali materiałem tkankowym pochodzącym od pacjentów HBsAg- oraz anty-HCV-seropozytywnych. Tien i wsp. wykazali wyłącznie błonową ekspresję  $\beta$ -kateniny w ponad 50% HCC<sup>241</sup>. Jądrowy wzór ekspresji  $\beta$ -kateniny (22%) występował w guzach słabiej zróżnicowanych, a biorąc pod uwagę tło wirusowe HCC, jądrową lokalizację badacze ci wykazali w 38% pacjentów z HBV i u jedynie 15% pacjentów z zakażeniem HCV<sup>241</sup>.

Ponieważ w obecnej pracy nie dysponowano szczegółowymi danymi klinicznymi pacjentów z HCC (poza wiekiem, płcią pacjenta oraz *grading* nowotworów wątroby), trudno donieść się do wszystkich danych z piśmiennictwa. Jądrową akumulację  $\beta$ -kateniny w HCC szereg badaczy opisywało najczęściej w powiązaniu z somatycznymi mutacjami tego białka<sup>163,165,169,170,233,240,243</sup>. Kliniczne znaczenie jądrowej lokalizacji  $\beta$ -kateniny w guzach wątroby jest wciąż badane. Jedni autorzy dowodzą istotnego związku takiej lokalizacji białka z bardziej nasiloną aktywnością proliferacyjną hepatocytów oraz krótszym czasem przeżycia pacjentów<sup>165,240</sup>, inni – z mniejszą inwazyjnością HCC i dłuższym 5-letnim czasem przeżycia<sup>163,233</sup>. Grupa Mao i wsp. zasugerowała inną rolę *wild-type*  $\beta$ -kateniny w porównaniu z jej formą zmutowaną. Zmutowana forma tego białka miałaby być związana z podtypami HCC o lepszej prognozie<sup>163,233</sup>. Zgodnie z opisami z piśmiennictwa, mutacje w obrębie *CTNNB1* występują w późniejszym okresie rozwoju raka wątroby, a jądrowa akumulacja  $\beta$ -kateniny jako wynik aktywacji drogi Wnt/ $\beta$ -katenina - we wczesnych stadiach HCC, co sugeruje inne, poza mutacjami mechanizmy stabilizacji tego białka<sup>164,171,172,173,235</sup>. Ostatecznie wyróżniono dwa podtypy HCC, w zależności od molekularnych zmian dotyczących szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina, z mutacją *CTNNB1* (niski stopień złośliwości histologicznej i dobra prognoza) i bez mutacji  $\beta$ -kateniny (agresywny fenotyp, związany z zakażeniem HBV)<sup>172,174</sup>.

Na podstawie wyników dotyczących ekspresji  $\beta$ -kateniny w HCC badanych w ramach tej pracy wydaje się, że u większości pacjentów nie występowała mutacja  $\beta$ -kateniny, która skutkowałaby zwiększoną akumulacją białka w komórkach wątroby i jądrowym wzorem reakcji immunohistochemicznej. Nie można potwierdzić opisywanej przez innych autorów nadekspresji  $\beta$ -kateniny w HCC<sup>164,244</sup>. Należy jednak podkreślić duże różnice indywidualne w nasileniu reakcji IHC na  $\beta$ -kateninę jakie obserwowano u pacjentów z pierwotnym rakiem wątroby. W badaniu grupy Mao i wsp. na 372 pacjentów z HCC wykazano błonową ekspresję  $\beta$ -kateniny w 272 guzach wątroby, a jądrową w 100 przypadkach. W tej pierwszej grupie

guzów, w 148 HCC obserwowano obniżenie ekspresji  $\beta$ -kateniny (podobnie jak w obecnej pracy). Ta redukcja ekspresji nie była skorelowana z inwazją guza i prognozą<sup>163</sup>. Nadekspresję E-kadheryny i obu katenin ( $\alpha$  i  $\beta$ ) w części guzów oraz pozytywną korelację pomiędzy ekspresją katenin a stopniem zróżnicowania HCC wykazał natomiast zespół Ihara i wsp.<sup>244</sup>. Analiza ilościowa przeprowadzona w ramach obecnej pracy wykazała istotnie niższą ekspresję  $\beta$ -kateniny w grupie z HCC zarówno w porównaniu z kontrolą, jak i z ekspresją w bioptatach wątroby pacjentów z pzw C.

Zgodnie z celem pracy postanowiono zbadać ekspresję  $\beta$ -kateniny przede wszystkim w wątrobie pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (ponad 20-letnim), jako czynnikiem ryzyka marskości wątroby i HCC. Spodziewano się zmian w poziomie ekspresji  $\beta$ -kateniny - białka połączeń międzykomórkowych, a w razie aktywacji drogi Wnt - czynnika o potencjalnym znaczeniu w kancerogenezie wątrobowej. Wyniki wskazują na duże indywidualne różnice w tkankowej ekspresji białka – od pojedynczych komórek ze słabą reakcją IHC, do licznych immunopozytywnych hepatocytów rozsianych po całym bioptacie wątroby. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w średniej wartości ekspresji  $\beta$ -kateniny w bioptatach wątroby z pzw C w porównaniu z kontrolą. Nie było więc spodziewanej nadekspresji białka. Nie obserwowano jądrowego wzoru reakcji IHC na to białko. Prócz typowo błonowej reakcji na  $\beta$ -kateninę, obserwowano występowanie mieszanej lokalizacji białka (błonowo-cytoplazmatyczna), jak i wyłącznie cytoplazmatyczny wzór reakcji IHC w hepatocytach, cholangiocytych i komórkach nacieków zapalnych (44%). Uzyskane wyniki badań nad lokalizacją  $\beta$ -kateniny w pzw C są zgodne z innymi wynikami badań, gdzie z zastosowaniem metod immunocytochemicznych wykazano obecność tego białka na błonach komórkowych hepatocytów i komórek nabłonka przewodów żółciowych międzyzrazikowych w wątrobie zakażonej HCV<sup>245</sup>. Autorzy cytowanej pracy stosowali skrawki mrożeniowe do swych badań i to wyłącznie marskiej wątroby, a także inne przeciwciała pierwszorzędowe niż w obecnej pracy. Nie obserwowali jądrowej lokalizacji białka, a zwiększona ekspresja  $\beta$ -kateniny obserwowana była głównie w proliferujących przewodach żółciowych, obecnych licznie w przegrodach łącznotkankowych marskiego narządu<sup>245</sup>. Lokalizacja  $\beta$ -kateniny w wątrobie kontrolnej oraz z pzw C i HCC jest zgodna także z obserwacjami Ihara i wsp., którzy silniejszą reakcją IHC opisywali w komórkach nabłonka cholangiocytych (zwłaszcza proliferujących) oraz hepatocytach z cechami regeneracji. Nie można odnieść się do tych wyników badań, gdyż

w obecnej pracy badano nasilenie reakcji IHC na całe pole miększu wątroby, bez rozgraniczania reakcji w obrębie hepatocytów i cholangiocytołów. Ihara i wsp. u pacjentów z HCC dowiedli związku pomiędzy ekspresją katenin a stopniem histologicznego zróżnicowania HCC<sup>244</sup>, czego nie udało się wykazać w grupie HCC badanych w tej pracy. Obniżenie ekspresji  $\beta$ -kateniny, które wykazano w badanych w tej pracy wątrobach z HCC, znalazło swe odniesienie natomiast w pracy innych autorów<sup>246</sup>. Zredukowaną ekspresję tego białka obserwowano u 42 % pacjentów, a całkowity brak ekspresji u 13% chorych z HCC. Wykazano również korelację pomiędzy zredukowaną ekspresją  $\beta$ -kateniny i zaawansowaniem guza i jego wielkością oraz tworzeniem wewnątrzwątrobowych przerzutów. Ani ekspresja  $\beta$ -kateniny, ani E-kadheryny nie były jednak niezależnymi czynnikami złej prognozy w HCC<sup>246</sup>. Obniżoną ekspresję  $\beta$ -kateniny wykazano również w HCC na tle zakażenia HBV (58% chorych) w porównaniu z HCC bez tła wirusowego (19%)<sup>247</sup>. Z kolei Guo i wsp. wykazali pozytywną ekspresję  $\beta$ -kateniny u ok. 47% mężczyzn i 63% kobiet z HCC. Pozytywną ekspresją nazywali obecność sygnału IHC o lokalizacji błonowej w powyżej 50% komórek nowotworowych. Nieprawidłową ekspresją  $\beta$ -kateniny definiowali jako obecność ektopowej ekspresji tego białka (cytozol, jądra komórkowe) w co najmniej w 10% komórek nowotworowych i/lub brak pozytywnego sygnału na to białko<sup>248</sup>. Nie da się dokładnie porównać badanych w ramach tej pracy HCC (92% pozytywnych przypadków) z uzyskanymi przez wspomnianego autora<sup>248</sup>. Oceniając wyłącznie ektopową lokalizację białka (cytoplazmatyczny i mieszany wzór ekspresji) w HCC tej pracy, obraz taki dotyczył zbliżonego odsetka pacjentów z HCC w porównaniu z uzyskanym przez Guo i wsp. (36% vs. 33%, odpowiednio). Natomiast nie można potwierdzić na podstawie obecnej pracy, niższego odsetka „nieprawidłowej” ekspresji  $\beta$ -kateniny w kontroli w porównaniu z HCC, jak przedstawili to autorzy wspomnianego doniesienia<sup>248</sup>. Na uzyskany w tej pracy wynik ma wpływ prawdopodobnie niska liczebność grupy kontrolnej (n=8) w porównaniu z kontrolą w cytowanej pracy (n=30).

Wśród 7 innych białek,  $\beta$ -katenina znalazła się również na liście surowiczych markerów różnicujących przewlekłe zapalenie wątroby od HCC<sup>249</sup>. Istotnie wyższe stężenia tego białka uzyskali pacjenci z HCC (mediana 651 pg/ml) w porównaniu z chorymi z przewlekłym zapaleniem wątroby (w tym na tle zakażenia HCV) (mediana 575 pg/ml)<sup>249</sup>. Co istotne, stężenie  $\beta$ -kateniny uznano za komplementarny ze stężeniem AFP, marker HCC, ważny zwłaszcza u pacjentów z „niediagnostycznym” stężeniem AFP<sup>249</sup>. Grupa Zekri i wsp. w populacji osób z

przewlekłym zakażeniem HCV (n=28) potwierdziła wyższe stężenie  $\beta$ -kateniny w surowicy krwi tych pacjentów w odniesieniu do zdrowych nosicieli HCV i kontroli. Wyższym stężeniem od pacjentów z zakażeniem HCV cechowali się chorzy z HCC. Autorzy ci potwierdzają wcześniejsze obserwacje na temat zwiększonego surowiczego stężenia  $\beta$ -kateniny jako nieinwazyjnego diagnostycznego i prognostycznego markera HCC. Autorzy ci uznali wartość *cut-off* dla poziomu białka  $\geq 997,3$  pg/ml w różnicowaniu pacjentów z HCC i przewlekłym zapaleniem wątroby. Wykazali ponadto wyższą czułość i specyficzność stężenia  $\beta$ -kateniny w porównaniu ze stężeniem sICAM-1<sup>187</sup>.

W ostatnich latach podkreśla się natomiast inne ciekawe zależności HCV- $\beta$ -katenina. Dowiedziono eksperymentalnie roli białek niestrukturalnych (głównie NS5A) oraz białka rdzeniowego (białko C, core) HCV w indukowaniu szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina<sup>77,98,188,189</sup>. Wykazano jednak, iż w samej przemianie nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) mediowanej przez NS5A, droga sygnałowa z udziałem  $\beta$ -kateniny nie jest wymagana<sup>250</sup>.

Poznano mechanizmy działania białek HCV na wzrost stabilizacji i akumulacji  $\beta$ -kateniny<sup>98</sup>. Podwyższony poziom  $\beta$ -kateniny w komórce wynikać ma głównie z aktywacji ścieżki PI3K/Akt, choć wykazano zjawisko stabilizacji tego białka niezależnie od Akt i GSK-3 $\beta$ <sup>99</sup>. Zwiększona ekspresja  $\beta$ -kateniny w komórce zakażonej HCV prowadzi również do aktywacji promotora *c-Myc* ze wzrostem ekspresji tego onkogenu i konsekwencjami (wzrost reaktywnych form tlenu, zaburzenia funkcji mitochondriów, zwiększone uszkodzenie DNA i zaburzenia cyklu komórkowego)<sup>188,251</sup>. Bezpośrednią aktywację ścieżki Wnt/ $\beta$ -katenina wykazano w modelu *in vitro* również w przypadku białka rdzeniowego HCV, które zwiększało poziom aktywnej formy  $\beta$ -kateniny z jądrową akumulacją tego białka i powodowało wzrost genowej ekspresji licznych ligandów Wnt<sup>77,252</sup>.

W badaniach obecnej pracy nie obserwowano istotnej zależności pomiędzy tkankową ekspresją  $\beta$ -kateniny a aktywnością proliferacyjną hepatocytów (ekspresja antygenu Ki-67, cykliny D1) u pacjentów z pzw C. W analizie takiej, i to nawet u pacjentów z HCC przeprowadzonych przez grupą Prange i wsp. również nie udało się wykazać zależności pomiędzy jądrową ekspresją  $\beta$ -kateniny i cykliny D1<sup>253</sup>. W obecnej pracy nie udało się uchwycić znamiennych różnic w ekspresji tego białka w zależności od nasilenia zmian zapalnych (*grading*), zaawansowania włóknienia (*staging*) oraz stłuszczenia wątroby. Nie wykazano istotnych korelacji z wynikami badań pracownianych, w tym testów funkcji wątroby czy stężeniem HCV RNA. Na wyniki te



wpływ mógł mieć niski odsetek chorych z bardziej zaawansowanymi zmianami w wątrobie (marskość wątroby u zaledwie 3 chorych, przewaga małej aktywności zapalnej w bioptatach wątroby, cechy stłuszczenia u połowy chorych). Nie obserwowano również znamienych różnic w ekspresji białek cyklu komórkowego (Ki-67, cyklina D1) między grupą z pzw C i kontrolą, choć u pacjentów z pzw C obserwowano pozytywny związek między tkankową ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 (ale nie cykliny D1) i nasileniem zmian histologicznych wątroby (aktywność zapalna, włóknienie, stłuszczenie wątroby).

Podsumowując tę część badań należy podkreślić uderzające zmiany w lokalizacji komórkowej  $\beta$ -kateniny w długotrwałym przewlekłym zakażeniu HCV w porównaniu z kontrolą, co może skutkować zaburzeniami funkcji tego białka w zaawansowanych stadiach pzw C. Ocena znaczenia klinicznego nasilenia ekspresji tego białka (redukcja) wymaga jednak kontynuacji badań, z uwzględnieniem np. tkankowej ekspresji białek wirusowych HCV u chorych z przewlekłym zakażeniem HCV. Interesującym byłoby badanie innych składników kompleksu ubikwitynującego  $\beta$ -kateniny, tj. APC, aksyny i kinaz np. GSK-3 $\beta$  czy Akt, które decydują o dostępności „wolnej” kateniny i jej akumulacji w cytoplazmie czy przemieszczaniu się do jądra komórkowego<sup>103</sup>. Dla lepszej metaanalizy danych, także w HCC - należałoby ujednoczyć systemy oceny ekspresji tego białka, zwłaszcza precyzyjnie zdefiniować pojęcie prawidłowej i nieprawidłowej tkankowej ekspresji tej cząsteczki adhezyjnej.

### ***Ekspresja E-kadheryny***

Nabłonkowa E-kadheryna (zwana także ECAM, ang. *epidermal cell adhesion molecule*) należy do kadheryn typu I i występuje w połączeniach przylegających (ang. *adherens junctions*) komórek nabłonkowych, odpowiadając za ich spójność.  $\beta$ -katenina przyłącza się do cytoplazmatycznej domeny E-kadheryny i przez łączenie z  $\alpha$ -kateniną, łączy ją z aktywną cytoszkieletu, tworząc strukturalno-funkcjonalną E-kadherynowo-kateninową jednostkę (ECCU) o silnych właściwościach adhezyjnych<sup>197</sup>. E-kadheryna jest produktem genu *CDH1* (chromosom 16), który zachowuje się jak klasyczny gen supresorowy dla guzów<sup>158</sup>. Mutacje *CDH1* z utratą ekspresji tkankowej E-kadheryny opisano w stosunkowo nielicznych nowotworach u człowieka, m.in. raku piersi i żołądka<sup>158,193,205</sup>. W ludzkim HCC występują głównie zmiany epigenetyczne E-kadheryny (w większości hypermetylacje promotora *CDH1*)<sup>205,215,254</sup>. Zmiany te opisano u pacjentów z Australii i to zarówno w wątrobie ze

zmianami złośliwymi, jak i niezłośliwymi, ale tylko w jednym przypadku wykazano równoczesne obniżenie tkankowej ekspresji E-kadheryny<sup>237</sup>. Badaniami z użyciem technik immunocytochemicznych u pacjentów z HCC wykazywano również obniżenie błonowej ekspresji E-kadheryny, szczególnie duże w bardziej złośliwych histologicznie postaciach HCC<sup>244,253</sup>. Wykazano także, iż obniżenie ekspresji  $\alpha$ - i  $\gamma$ -kateniny (ale nie  $\beta$ -kateniny) wyprzedzało obniżenie ekspresji E-kadheryny w HCC<sup>255</sup>.

Spadek ekspresji E-kadheryny lub utrata prawidłowej lokalizacji białka w miejscu kontaktów komórka-komórka obserwowany był w miejscach EMT w czasie progresji guza, co łączyło się z nadekspresją uwolnionej z połączeń międzykomórkowych  $\beta$ -kateniny<sup>193</sup>. Wykazano również, iż E-kadheryna jest celem molekularnego biomarkera, tj. białka regulatorowego 14-3-3 $\epsilon$  w modulowaniu progresji HCC<sup>256</sup>.

Wykrywalność (częstość występowania) E-kadheryny w wątrobie w badanych grupach pacjentów tej pracy była istotnie niższa w HCC (58%) i pzw C (83%) w porównaniu z kontrolą (100%). Jest to zgodne z wynikami innych autorów nad badaniem ekspresji tego białka w HCC. Zhai i wsp. wykazali prawidłową ekspresję E-kadheryny w 40%, obniżoną w 41%, a nieobecną u 16% chorych<sup>246</sup>.

Analiza morfometryczna przeprowadzona w tej pracy wykazała również znamienne niższą ekspresję E-kadheryny w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i w HCC w porównaniu z kontrolą. Co ciekawe ekspresja E-kadheryny u pacjentów z pzw C była istotnie niższa również w porównaniu z HCC. W badanych w obecnej pracy HCC oraz w pzw C obserwowano więc, zgodnie z oczekiwaniami, obniżenie ekspresji E-kadheryny, jednak (jak opisano wcześniej) nie towarzyszyła temu nadekspresja  $\beta$ -kateniny. W obu grupach chorych wykazano wręcz pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją E-kadheryny i  $\beta$ -kateniny, czyli spadkowi ekspresji E-kadheryny towarzyszył spadek ekspresji  $\beta$ -kateniny u tych chorych. Podobny wynik uzyskała grupa Zhai i wsp. w badanych przez siebie HCC. Wykazano również, podobnie jak w obecnej pracy, pozytywną korelację pomiędzy ekspresją E-kadheryny i wszystkich katenin, w tym  $\beta$ -kateniny<sup>246</sup>. Autorzy ci na blisko 100 HCC wykazali obniżenie ekspresji E-kadheryny w 69% przypadków, a  $\beta$ -kateniny u 63% chorych. Natomiast Ihara i wsp. obserwowali obniżenie E-kadheryny i  $\alpha$ -kateniny w bardziej rozsianych *thick trabecular-type HCCs*, a większą ekspresję  $\beta$ -kateniny obserwowali jedynie w regenerujących hepatocytach i proliferujących cholangiocytych<sup>244</sup>. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych

w obecnej pracy, Ihara i wsp. obserwowali raczej słaby sygnał IHC na badane białka w hepatocytach i cholangiocytach kontrolnej wątroby<sup>244</sup>.

W obecnych badaniach nie wykazano istotnego współistnienia ekspresji E-kadheryny z typowymi zmianami histologicznymi wątroby pacjentów z pzw C (*grading, staging, stłuszczenie wątroby*), a jedynie słabą negatywną korelację pomiędzy ekspresją E-kadheryny i antygenu proliferacyjnego Ki-67. Może to potwierdzać tendencję do obniżania ekspresji E-kadheryny wraz ze wzrostem aktywności proliferacyjnej hepatocytów w przewlekłym procesie zapalnym. Nie udało się jednak zaobserwować żadnych istotnych zależności pomiędzy ekspresją E-kadheryny a cykliny D1 u pacjentów z pzw C. Nie można powołać się na podobne obserwacje w piśmiennictwie. Natomiast w przypadku raków wątroby pozytywna jądrowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny, redukcja błonowej ekspresji E-kadheryny i zwiększona ekspresja Ki-67 obserwowana była w stopniach złośliwości histologicznej I i III HCC<sup>165</sup>. Inni autorzy opisali korelacje między obniżeniem ekspresji E-kadheryny i kateniny a wielkością guza, wyższym jądrowym indeksem czy krótszym przeżyciem pacjenta. Ekspresja samej E-kadheryny była zależna od wartości indeksu mitotycznego<sup>257</sup>. Podobnie jak w obecnej pracy, niektórzy badacze wykazali duże różnice w immunocytochemicznej ekspresji E-kadheryny w zależności od pacjenta z HCC, z obniżeniem ekspresji (w 35% przypadków HCC) i jej nadekspresją (u 40% chorych)<sup>254</sup>. Spadek lub utrata ekspresji E-kadheryny wynikały ze zmian genetycznych (głównie LOH) lub epigenetycznych E-kadheryny. Inwazja guza poprzez naczynia krwionośne była częstsza w tych HCC, które wykazywały szczególnie nasiloną ekspresję błonową kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina<sup>254</sup>. Zdaniem autorów tej pracy, rola E-kadheryny w HCC jest więc paradoksalna, bo nie obniżonej a zwiększonej (i to błonowej) ekspresji tej molekule adhezyjnej towarzyszył wzrost guza i jego szerzenie się drogą krwi<sup>254</sup>. W badaniach Zhai i wsp. obniżenie ekspresji E-kadheryny (obecnej tylko na błonach komórek nowotworowych) oraz  $\beta$ -kateniny (bardziej urozmaicony wzór ekspresji, tylko w 6/100 guzów – reakcja jądrowa) towarzyszyło gorzej zróżnicowanym typom raka w porównaniu z dobrze lub umiarkowanie zróżnicowanym HCC. Wykazano również zależności między obniżoną ekspresją  $\beta$ -kateniny i wielkością guza<sup>246</sup>. Podobnie Guo i wsp. wykazując spadek ekspresji E-kadheryny w HCC (z- i bez przerzutów) w porównaniu z kontrolą, obserwowali pozytywne korelacje ze stopniem złośliwości histologicznej (*grade*) guzów, zaawansowaniem TNM i tworzeniem miejscowych przerzutów do węzłów chłonnych. Autorzy ci nie znaleźli korelacji między wiekiem, płcią,

zakażeniem HBV, obecnością marskości wątroby, stężeniem AFP czy średnicą guza<sup>248</sup>. Nie dysponując szczegółowymi danymi u pacjentów z HCC, badanymi w tej pracy – nie można odnieść się do wyników badań innych autorów. W odróżnieniu od wspomnianych autorów, nie znaleziono korelacji między ekspresją E-kadheryny a *grade* HCC, ale podobnie jak inni badacze – nie obserwowano korelacji pomiędzy ekspresją E-kadheryny a wiekiem i płcią pacjenta.

U pacjentów z pzw C oraz fragmentach pierwotnych raków wątroby (HCC) badanych w ramach tej pracy, komórkowa lokalizacja E-kadheryny dotyczyła (podobnie jak  $\beta$ -kateniny) również w przewodzie błon komórkowych hepatocytów i cholangiocytów (56% i 77%, odpowiednio). U ponad 1/4 pacjentów z pzw C, ale jedynie w trzech przypadkach HCC, obserwowano błonowo-cytoplazmatyczny wzór reakcji IHC. Wyniki dotyczące wzoru ekspresji E-kadheryny w HCC są zasadniczo zgodne z opisami z piśmiennictwa, w których udokumentowano obecność głównie błonowej reakcji IHC na E-kadherynę, a błonowej, cytoplazmatycznej i jądrowej na  $\beta$ -kateninę<sup>246</sup>.

Należy przypomnieć, iż nie dysponowano danymi na temat etiologii wirusowej badanych fragmentów wątroby z HCC (poza 1 chorym z zakażeniem HCV).

Z danych z piśmiennictwa wiadomo, iż w słabo zróżnicowanych HCC występuje cytoplazmatyczna redystrybucja E-kadheryny, a nawet całkowita utrata ekspresji tego białka, co sugeruje zjawisko EMT<sup>167</sup>. W dysocjacji błonowego kompleksu kadheryna/ $\beta$ -katenina z jądrową akumulacją  $\beta$ -kateniny bierze udział TGF- $\beta$ <sup>167</sup>. Sygnały inicjowane przez ten czynnik wzrostu są więc potencjalnymi induktorami EMT. W jednej z prac z ostatnich lat wykazano, że profil ekspresji ze zmniejszonym poziomem E-kadheryny a zwiększonym wimentyny, korelował z gorszym zróżnicowaniem histologicznym (bardziej złośliwym) HCC, inwazją naczyniową i pozawątrobowymi nawrotami choroby po leczeniu operacyjnym. Niższa ekspresja E-kadheryny obecna była również u pacjentów z krótszym okresem życia bez objawów HCC w porównaniu z pacjentami z wysoką ekspresją tego białka<sup>258</sup>.

Ocena tkankowego wskaźnika ekspresji E-kadheryna/ $\beta$ -katenina w obecnej pracy wykazała, iż indeks ten był istotnie niższy u pacjentów z HCC w porównaniu z pacjentami z pzw C i kontrolą. Wskaźnik ten oddaje lepiej obniżenie ekspresji obu białek w komórkach nowotworowych HCC, sugerując utratę połączeń międzykomórkowych typu *adherens junctions* w tym typie patologii wątroby. Ze względu na brak istotnych korelacji ze złośliwością

histologiczną HCC badanych w obecnej pracy, znaczenie kliniczne tego wskaźnika jest jednak niepewne. Nie uzyskano znamiennej różnicy w wartości tego indeksu w wątrobie z przewlekłym zakażeniem HCV i kontrolą. Nie było, podobnie jak w przypadku samych białek ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna), istotnych korelacji pomiędzy wartością wskaźnika E-kadheryna/ $\beta$ -katenina a parametrami histologicznymi i wynikami badań pracownianych u pacjentów z pzw C. Trudno skomentować ten wynik w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Pojęcie ekspresji kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina używane jest w piśmiennictwie nie tyle dla oznaczenia wzajemnej proporcji obu białek, ile dla współwystępowania obu komponent w kompleksie, budującym konkretny typ połączenia międzykomórkowego<sup>193,246,237</sup>. W procesie tworzenia połączeń międzykomórkowych typu *adherens junctions*, kadheryny podlegają konstytutywnej endocytozie i recyklingowi na powierzchnię błony komórkowej. Wykazano, iż po dysocjacji *adherens junctions*,  $\beta$ -katenina podlega internalizacji razem z E-kadheryną i oba białka akumulują się w tzw. okołojądrowym kompartmentie recyklinowym (ang. *endocytic recycling compartment*, ERC). Obecność prawidłowego kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina warunkuje integralność komórek nabłonkowych oraz nadzoruje sygnalizację Wnt/ $\beta$ -katenina<sup>193</sup>. Istnieje ścisły związek między obniżoną ekspresją kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina a rozwojem i progresją HCC<sup>246</sup>.

U pacjentów z HCC wykazano istotnie zmienione i to podwyższone surowicze stężenia E-kadheryny w porównaniu z kontrolą, jednak nie były one skorelowane z tkankową ekspresją tego białka<sup>222</sup>. Szczególnie wysokie stężenia E-kadheryny były związane z wczesnym nawrotem choroby po operacji oraz obecnością pozawątrobowych przerzutów<sup>222</sup>.

Produkty genomu HCV wpływają dwójako na ekspresję E-kadheryny, pośrednio przez modulację ścieżki Wnt/ $\beta$ -katenina, a udział bezpośredni zależy od interakcji białka rdzeniowego (białka C) HCV i E-kadheryny. Białko C zmniejsza ekspresję E-kadheryny na poziomie transkrypcyjnym poprzez hypermetylację wysp CpG w promotorze genu CDH1<sup>190,191</sup>. Redukcja ekspresji E-kadheryny w wyniku działania białka C ułatwia oddzielanie się sąsiadujących komórek i migrację komórek daleko od pierwotnego miejsca guza<sup>190</sup>. Wobec dwukrotnie zwiększonego ryzyka HCC *in vivo* wywołanego przez genotyp 1b HCV<sup>259</sup>, ważne wydaje się poznanie mechanizmów obniżania ekspresji E-kadheryny poprzez działanie wirusowego białka C właśnie o genotypie 1b HCV<sup>191</sup>. Wyniki tych autorów dowodzą, iż białko C zwiększa ekspresję jednej z histonowej deacetylazy, białka *sirtuin 1*, kodowanego przez

*SIRT1*. Wiążąc się z promotorem *CDHI* indukowało ono histonową deacetylację i metylację połączoną z transkrypcyjną represją genu<sup>191</sup>. Należy jednocześnie dodać, iż te badania nie wykazały wpływu białka C na ekspresję  $\beta$ -kateniny i jedynie słabą aktywację fosforylacji kinazy GSK-3 $\beta$ <sup>191</sup>

Już wcześniejsze badania dowodzą udziału HCV w przemianie nabłonkowo-mezenchymatycznej (EMT). Białko rdzeniowe HCV powoduje redukcję ekspresji antagonistów Wnt z rodziny SFRP (ang. *secreted frizzled-related protein*) w mechanizmie hypermetylacji promotora *SFRP-1*. Skutkuje to aktywacją drogi sygnałowej Wnt i poprzez indukcję EMT, nasila agresywność HCC<sup>260</sup>. W hodowli komórek pierwotnego raka wątroby zakażonych genotypem 1b lub 2a HCV wykazano wzrost ekspresji licznych markerów EMT, m.in. wimentyny, białek: snail, slug i twist, któremu towarzyszył spadek ekspresji E-kadheryny. Hepatocyty zakażone HCV zmieniały fenotyp (wyższa ekspresja białka fibroblastów FSP-1) i demonstrowały znacząco zwiększony poziom fosforylacji na poziomie SER<sup>552</sup>, która w odróżnieniu od fosforylacji SER<sup>45</sup> i THR<sup>41</sup>, miałyby odpowiadać za jądrową translokację  $\beta$ -kateniny i aktywację transkrypcji genów<sup>192</sup>. Zdaniem autorów tej pracy, zakażenie tymi genotypami HCV hepatocytów modulowało fosforylację  $\beta$ -kateniny, zwiększając jej transkrypcyjną aktywność potrzebną w procesie EMT. Inni badacze w liniach komórkowych *hepatoma* zakażonych HCV oraz na bioptatach wątroby pacjentów z zakażeniem HCV, wykazali znaczący wzrost ekspresji białek cytoszkieletu komórkowego (filaminy A i wimentyny) w porównaniu z kontrolą. Wzrost ekspresji filaminy w zakażeniu HCV był zależny od ekspresji zarówno jego białek niestrukturalnych (NS3 i NS5A), jak i białka rdzeniowego (białko C). Białko C wpływało dodatkowo na wzrost ekspresji wimentyny. Nadekspresja obu białek cytoszkieletu zdaniem autorów pracy jest kluczowym *adaptive response* ludzkich hepatocytów na zakażenie HCV<sup>261</sup>. Bezpośrednie interakcje między białkami HCV i filaminą miałyby odpowiadać za formowanie kompleksu replikacyjnego HCV i za subkomórkową dystrybucję HCV w zakażonej komórce<sup>261</sup>. Niedawno doniesiono, iż w warunkach *in vitro* hepatocyty zakażone HCV cechują się zredukowaną ekspresją E-kadheryny oraz indukcją produkcji mezenchymalnego markera, tj. N-kadheryny<sup>262</sup>.

Aby choć częściowo odpowiedzieć na zagadnienie udziału przewlekłego zakażenia HCV w EMT, postanowiono zbadać ekspresję wybranych białek tego procesu, tj. N-kadheryny i wimentyny.

### ***Ekspresja N-kadheryny***

N-kadheryna zwana również N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*) lub cząsteczką CD56 należy również do rodziny zależnych od wapnia CAMs, podrodziny klasycznych kadheryn. W wątrobie pojawia się już życiu embrionalnym, a po urodzeniu następuje stopniowe rozmieszczenie E-kadheryny w okolicach okołowrotnych, a N-kadheryny w obszarach okołozylnych tego narządu<sup>263</sup>. Nieprawidłową ekspresję (głównie nadekspresję) N-kadheryny wykazywano w niektórych nowotworach pochodzenia nabłonkowego i w liniach nowotworów złośliwych, także tych z jednoczesną ekspresją E-kadheryny. N-kadheryna promuje ruchliwość komórek, inwazję i przerzutowanie, nawet w obecności E-kadheryny<sup>264,265</sup>. Nazwa N-kadheryny pochodzi od występowania tego białka przede wszystkim w komórkach nerwowych, w których odpowiedzialna jest za ich prawidłową mielinizację. Komórki nabłonkowe posiadają typową ekspresję E-kadheryny, zaś komórki pochodzenia mezenchymatycznego mogą ekspresymować liczne kadheryny, w tym N-kadherynę<sup>197</sup>.

W obecnej pracy wybrano do badań ten typ kadheryny w związku z obserwacjami tzw. przełączania kadheryn (*E- to N-cadherin switching*) w kancerogenezie (w tym hepatokancerogenezie). Pozytywną ekspresję N-kadheryny zaakceptowano jako diagnostyczne i prognostyczne kryterium transformacji nowotworowej<sup>198,266</sup>. Redukcja ekspresji E-kadheryny na korzyść ekspresji N-kadheryny i wimentyny determinują także zjawisko przemiany nabłonkowo-mezenchymatycznej (EMT), które może łączyć się ze zmianą fenotypu komórek na bardziej ruchliwe i inwazyjne<sup>198</sup>. Zjawisko EMT opisuje się także w przypadku niedużych zmian w ekspresji E-kadheryny, ale z pojawieniem się ekspresji N-kadheryny lub nawet w sytuacjach, w których obserwuje się koekspresję E-kadheryny z innymi typami kadheryn (R-, T-, -P, i kadheryny-11) w obrębie tych samych komórek<sup>198,267</sup>. Dowiedziono udziału N-kadheryny w przerzutowaniu w HCC<sup>265</sup>. Badania Zhan i wsp. wykazały obniżenie ekspresji N-kadheryny w 53% guzów. Redukcja ekspresji tej kadheryny była skorelowana z histologicznie gorzej zróżnicowanym HCC, większą inwazją naczyniową oraz znaczącym skróceniem czasu remisji (*disease-free*) po operacyjnym usunięciu guza<sup>265</sup>. Inne badania wykazały, iż za zmianę funkcji komórki, tj. promocję w kierunku EMT i zwiększanie ruchliwości komórek odpowiada 69-aminokwasowy zewnątrzkomórkowy fragment (EC-4) N-kadheryny<sup>266</sup>. Udział N-kadheryny w progresji ludzkiego raka wątrobowokomórkowego polega również na wywieraniu aktywności anty-apoptotycznej na komórki guza<sup>268</sup>.

Stosunkowo niedawno potwierdzono, iż w fizjologicznych warunkach prawidłowa jest koegzystencja obu kadheryn (E- i N-) zarówno w hepatocytach, cholangiocytych, komórkach nabłonka przewodów trzustkowych i pęcherzyka żółciowego, jak i w komórkach zmienionych nowotworowo<sup>269</sup>. Wykazano bowiem istnienie nie tylko, jak pierwotnie sądzono, homotypowych oddziaływań międzykomórkowych, ale obecność heterodimerów zbudowanych z obu kadheryn w *adherens junctions*. Wykazanie tych heterodimerów w komórkach nowotworowych może służyć jako diagnostyczny, komórkowo-specyficzny marker zwłaszcza w przypadku występowania odległych przerzutów nowotworów wywodzących się z wątroby, dróg żółciowych i przewodów trzustkowych<sup>269</sup>.

W ramach tej pracy, ekspresję N-kadheryny wykryto w wątrobie u zaledwie dwóch pacjentów z zakażeniem HCV oraz u 17% pacjentów z HCC i były to znamienne niższe odsetki wykrywalności tego białka niż w kontroli (50%). Jest to zaskakująco niska wykrywalność pozytywnej reakcji IHC na N-kadherynę w porównaniu z danymi z piśmiennictwa, gdzie obecność tego białka wykazano we wszystkich badanych HCC oraz w wątrobie kontrolnej<sup>255</sup>.

W obecnej pracy ekspresję N-kadheryny w pzw C obserwowano w cytoplazmie hepatocytów, a tylko w kontrolnym narządzie dominowała ekspresja błonowa. W komórkach HCC lokalizacja N-kadheryny dotyczyła zarówno błon komórek nowotworowych, jak i cytoplazmy. Badania innych autorów potwierdzają obecność pozytywnej reakcji IHC głównie w miejscach kontaktów komórka-komórka<sup>255</sup>. Jest to również zgodne z najnowszymi obserwacjami o występowaniu E-N-kadherynowych heterodimerów w połączeniach międzykomórkowych typu *adherens junctions* w normalnych i zmienionych nowotworowo tkankach organizmu człowieka<sup>269</sup>. W HCC badanych przez grupę Cho i wsp. ekspresję N-kadheryny określono jako *dot-like discontinuous* i wykazano w 55% guzów wątroby. Spadek ekspresji N-kadheryny i "nieciągły" wzór ekspresji białka (obok redukcji E-kadheryny) korelował z bardziej zaawansowanym stadium HCC i zjawiska te uznano za czynniki wysokiego ryzyka nawrotu choroby po chirurgicznym leczeniu<sup>270</sup>. Niską ekspresję N-kadheryny (w pojedynczych hepatocytach) obserwowano w embrionalnym rozwoju wątroby u myszy. W miarę dojrzewania wątroby i w życiu postnatalnym ilość białka stopniowo wzrastała, co wiązało się ze zmianą rozmieszczenia N-kadheryny w miększu wątroby<sup>263</sup>.

Analiza ilościowa ekspresji N-kadheryny u pacjentów tej pracy, wykazała istotnie niższą ekspresję białka jedynie w wątrobie pacjentów z zakażeniem HCV w porównaniu z kontrolą (p



na granicy istotności). Ani w przypadku przewlekłego zapalenia wątroby na tle zakażenia HCV, ani w HCC nie obserwowano ewidentnego „zastępowania” ekspresji E-kadheryny N-kadheryną, które to zjawisko mogłoby świadczyć o zmianie fenotypu komórek i przemawiać za EMT. Obserwowano współwystępowanie obu kadheryn w wątrobie tych samych chorych. Ilościowa ekspresja N-kadheryny była bardzo niska w ocenianym materiale tkankowym. W grupie z pzw C nawet istotnie zredukowana w porównaniu z wątrobą kontrolną. Choć nie wykazano istotnych statystycznie różnic w nasileniu ekspresji N-kadheryny pomiędzy grupą HCC i kontrolą, w grupie HCC odnotowano pozytywne (choć dość słabe) korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją wszystkich białek adhezyjnych, tj.  $\beta$ -kateniny i E kadheryny oraz N-kadheryny oraz pomiędzy wzajemną ekspresją obu kadheryn. Nie udało się wykazać istotnych zależności pomiędzy ekspresją N-kadheryny a zaawansowaniem zmian histologicznych oraz wynikami badań pracownianych w badanych grupach chorych. Może to wynikać również (jak w przypadku ekspresji pozostałych białek w badanych grupach) ze zbyt słabo zróżnicowanych zmian histologicznych wątroby u pacjentów z pzw C. A w przypadku HCC badanych w tej pracy, u aż ~70% pacjentów z HCC wykazywano również dość jednorodny stopień złośliwości histologicznej HCC (*grading* 2).

Z niektórych danych z piśmiennictwa wynika, iż nieprawidłowa ekspresja kadheryn oraz efekt przełączania kadheryn, należy do późnych wydarzeń w kancerogenezie. Pokazano również, iż wpływ nieprawidłowej kadheryny na fenotyp komórki zależy do wielu czynników, m.in. kooperacji z receptorami kinaz tyrozynowych, przede wszystkim z FGF<sup>198</sup>. Kadherynowy *switching* może prowadzić do zwiększania interakcji pomiędzy N-kadheryną i receptorami zwiększającymi wzrost i ruchliwość komórek guza oraz obniżanie negatywnej regulacji wywieranej przez E-kadherynę<sup>198</sup>.

Podsumowując tę część badań można wnioskować, iż w przewlekłym zapaleniu wątroby z długotrwałym zakażeniem HCV (>20 lat), nie obserwuje się ewidentnych tkankowych wykładników kadherynowego *switchingu* i EMT.

### ***Ekspresja wimentyny***

Białko wimentynę wybrano dla celów obecnej pracy, gdyż jest ona uznanym markerem EMT, zwłaszcza kiedy nadekspresji tego białka towarzyszy spadek ekspresji E-kadheryny<sup>192</sup>. Wimentyna jest białkiem budującym filamenty pośrednie i występuje głównie w komórkach

tkanek pochodzenia mezenchymatycznego (m.in. fibroblasty, makrofagi, komórki *endothelium* naczyń), a także w komórkach hodowanych, w tym transformowanych<sup>271,272</sup>. Jest białkiem zapewniającym integralność komórki, zwłaszcza w warunkach mechanicznego stresu<sup>271</sup>.

Badanie ekspresji wimentyny wykonano tylko w grupie z pzw C (w której obserwowano niższą niż w kontroli i HCC, ekspresję E-kadheryny) w odniesieniu do kontrolnej wątroby. Dysponując grupą chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby, różnie zaawansowanym włóknieniem narządu można było przypuszczać, iż ekspresja tego białka będzie zwiększona w porównaniu z wątrobą kontrolną. Udział wimentyny podkreśla się bowiem już w typie 2 EMT, który związany jest z regeneracją tkanek i narządowym włóknieniem<sup>273</sup>. U pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV (ponad 20 lat), zebranych w tej pracy, wykrywalność (częstość występowania) tego białka w biopsjach wątroby była jednak niższa (57%) niż w kontroli (88%). Białko to lokalizowano w cytoplazmie jedynie nielicznych komórek zatok wątrobowych (komórki Browicza-Kupffera i śródbłónka naczyń) i miejsce występowania tego białka jest zgodne z opisami w piśmiennictwie<sup>261,271,272</sup>. Nie było różnic w ilościowym nasileniu ekspresji tego białka w wątrobie z pzw C i w kontroli. Ekspresja wimentyny nie była istotnie zależna od ekspresji pozostałych białek adhezyjnych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, N-kadheryna) w wątrobie u pacjentów grupy badanej. Nie udało się wykazać również żadnych zależności pomiędzy ekspresją wimentyny a zmianami histologicznymi wątroby czy wynikami badań pracownianych. W innych badaniach, ale w odniesieniu do zmian nowotworowych wątroby (HCC i *adenocarcinoma*), immunocytochemiczną ekspresję wimentyny wykazano w 55% HCCs oraz 41% *adenocarcinoma* sugerując iż wimentyna jako marker w różnicowej diagnostyce nie ma wielkiego znaczenia<sup>272</sup>. Bose i wsp. stosując model pierwotnych hepatocytów zakażonych HCV oraz wykorzystując biopsaty z zakażeniem HCV, potwierdzili zwiększoną ekspresję markerów EMT na poziomie mRNA i białka, w tym wimentyny. Indukcja EMT *via* zakażenie HCV miałyby zachodzić poprzez aktywację ścieżki sygnałowej Akt/ $\beta$ -katenina<sup>192</sup>. Autorzy ci dowodzą, iż zakażenie HCV moduluje fosforylację  $\beta$ -kateniny (indukcja fosforylacji SER<sup>552</sup>, obniżanie fosforylacji SER<sup>45</sup>/THR<sup>41</sup>, aktywacja Akt) zwiększając aktywność transkrypcyjną białka, niezbędną w EMT. Nadmierna ekspresja markerów mezenchymatycznych (w tym wimentyny) miałyby odgrywać rolę w represji ekspresji E-kadheryny i innych białek strukturalnych połączeń komórka-komórka, promując mezenchymatyczny fenotyp<sup>192</sup>. Biorąc pod uwagę wpływ białek HCV na proces EMT

(szczególnie białka rdzeniowego), wykazano iż samo białko C nie indukuje EMT sugerując, iż inne białka HCV są zaangażowane w indukcję EMT<sup>192</sup>. Już wcześniejsze badania Ghosh i wsp. nad interakcjami białek HCV i białek cytoszkieletu komórkowego (filamina, wimentyna) również wykazały wzrost ekspresji obu białek i to zarówno w hepatocytach zakażonych HCV, jak również w modelu *in vivo* (bioptyki wątroby pacjentów z pzw C) w porównaniu z kontrolą<sup>261</sup>. Dodatkowo autorzy ci obserwowali kolokalizację filaminy z białkami niestrukturalnymi (NS3 i NS5A), a obu białek: filaminy i wimentyny częściowo również z białkiem rdzeniowym HCV<sup>261</sup>. Tak więc już te badania pokazały jedynie częściowe interakcje wimentyny z białkiem rdzeniowym HCV, a żadnych interakcji tego białka z niestrukturalnymi białkami HCV (NS3 i NS5A). Zdaniem autorów tej pracy, nadekspresja białek cytoszkieletu komórkowego gospodarza w komórkach wątrobowych zakażonych HCV, odzwierciedla mechanizmy adaptacyjne komórki na zakażenie. Być może oba białka cytoszkieletu pomagają również w tworzeniu kompleksu replikacyjnego HCV<sup>261</sup>. Nie można w pełni odnieść wyników uzyskanych w tej pracy do cytowanych badań zespołu Ghosh i wsp. ze względu na inne założenia pracy (interakcje białkami HCV z białkami cytoszkieletu komórkowego). Ponadto nie wiadomo, jakim dokładnie materiałem tkankowym dysponowali autorzy badań (zaawansowanie zmian histologicznych w wątrobie). Ekspresję filaminy i wimentyny badano z zastosowaniem innej metodyki (western blot, immunofluorescencja, ilościowy RT-PCR) niż w obecnej pracy.

Poziom wimentyny rozważano również jako surowiczy marker do wykrywania HCC o wielkości  $\leq 2$  cm. Potwierdzono, iż stężenia tego białka są istotnie wyższe nawet w guzach o tak małej średnicy w porównaniu z kontrolą<sup>274</sup>. Czułość testu wynosiła jednak ok. 41%, przy 87,5% specyficzności. Zwiększenie czułości i specyficzności wimentyny uzyskano badając jednocześnie stężenie AFP u tych chorych<sup>274</sup>. Późniejsze badania potwierdziły użyteczność badania stężenia wimentyny wraz z laminą B do wczesnego wykrywania HCC<sup>275</sup>.

Reasumując tę część uzyskanych wyników badań, kontynuacji wymaga badanie ekspresji tkankowej białek HCV w kontekście zmian ekspresji markerów EMT u pacjentów z długotrwałym zakażeniem HCV. Badania powinny być kontynuowane na materiale tkankowym, szczególnie u chorych z bardziej zaawansowanymi zmianami histopatologicznymi.

## WNIOSKI

1. Nieprawidłowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i rakiem wątrobowokomórkowym (HCC), wskazuje na zmiany strukturalne połączeń międzykomórkowych w patologicznie zmienionym narządzie.
2. Dominacja niejądrowej lokalizacji badanych białek adhezyjnych ( $\beta$ -kateniny, E- i N-kadheryny) przy braku nadekspresji  $\beta$ -kateniny w wątrobie z długotrwałym przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i HCC, sugeruje obecność nieaktywnej transkrypcyjnie formy  $\beta$ -kateniny w badanym materiale tkankowym.
3. Z obu białek adhezyjnych kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina, obniżona ekspresja E-kadheryny może być użytecznym wskaźnikiem zwiększonej proliferacji komórek wątrobowych i progresji przewlekłego zapalenia wątroby typu C.
4. Istotnie zmniejszona ekspresja E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i HCC w porównaniu z kontrolą, może stanowić wskaźnik przemiany nabłonkowo-mezenchymatycznej (EMT), nawet bez spodziewanych zmian w ekspresji N-kadheryny i wimentyny.

## STRESZCZENIE

### **Rola komórkowej ekspresji $\beta$ -kateniny i E-kadheryny jako markerów progresji zmian w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C**

Zakażenie wirusem C zapalenia wątroby (HCV) w 60-80% prowadzi do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby, w 40% do zaawansowanej marskości wątroby, w 60% przypadków do rozwoju pierwotnego raka wątroby. Mechanizmy kancerogenezy wątrobowej są wciąż niejasne. W warunkach fizjologicznych  $\beta$ -katenina odgrywa istotną rolę podczas rozwoju embrionalnego wątroby oraz w regeneracji tego narządu. W błonie komórkowej hepatocytów (głównie biegun żółciowy)  $\beta$ -katenina w kompleksie z E-kadheryną tworzy adhezyjne połączenia międzykomórkowe. W patologii natomiast  $\beta$ -katenina jest centralnym białkiem tzw. ścieżki kanonicznej szlaku Wnt/Fzd/ $\beta$ -katenina i może spełniać rolę onkogenu. Związki pomiędzy zaburzeniami ekspresji genowej tego białka a nasilaniem proliferacji komórkowej dotyczą głównie HCC o różnej etiologii oraz *hepatoblastoma*. Ekspresję komórkową  $\beta$ -kateniny oceniano różnymi metodami ilościowymi, co nie zawsze pozwala na dokładne porównanie wyników badań. Ostatnio podkreślana jest rola białek HCV (NS5A, białko C) w indukowaniu szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w hodowlach komórkowych. Nieliczne są wyniki badań na temat roli ekspresji genowej  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w przewlekłym zakażeniu HCV *in vivo*.

Celami pracy były: (1) Ocena komórkowej ekspresji białek adhezyjnych:  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (pzw C) i raku wątrobowokomórkowym (HCC) w odniesieniu do wybranych markerów proliferacji komórkowej, zmian histologicznych i danych klinicznych; (2) Ocena komórkowej ekspresji N-kadheryny i wimentyny jako wybranych wskaźników przemiany nabłonkowo-mezenchymatycznej (EMT) w wątrobie pacjentów z pzw C i HCC; (3) Określenie roli tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E- i N-kadheryny w progresji przewlekłego zapalenia wątroby typu C.

Grupę badaną stanowili pacjenci z pzw C z udokumentowanym długotrwałym zakażeniem HCV ( $\geq 20$  lat) (n=63). Wszyscy pacjenci wykazywali pozytywne anty-HCV (HCV version 3.0 AXYM System, Abbott) oraz HCV RNA w surowicy krwi (AMPLICOR HCV<sup>TM</sup> test, version 2.0 (ROCHE, Mannheim, Germany; czułość testu 600 IU/ml) i nie byli zakażeni innymi wirusami hepatotropowymi (HBV, HCMV, EBV, HIV-1). Wykluczono inne

przyczyny pzw (niedobór  $\alpha_1$ -antytrypsyny, choroba Wilsona, choroba alkoholowa). Biopsje wątroby zostały wykonane w latach 2005-2010 w ramach diagnostyki histopatologicznej przed leczeniem przeciwwirusowym. Fragmenty wątroby z HCC pochodziły z panelu tkankowego (Cybrdi Inc.; Maryland, USA, n=57) oraz archiwalnych bloczków parafinowych z HCC (n=4). Materiał kontrolny (n=8) stanowiły fragmenty wątroby HCV-negatywnej. Materiał tkankowy oceniono w rutynowym barwieniu hematoksyliną i eozyną, metodą srebrową i metodą trójbarwną Mallory'ego. Oceniono stopień nasilenia zmian zapalnych (*grading*) oraz zaawansowania włóknienia (*staging*) w skali punktowej wg METAVIR. Z zastosowaniem technik immunocytochemicznych (system detekcyjny *new polimer-based IHC*, technika ImmnoMax) oraz hybrydyzacji *in situ* (sondy znakowane digoksygeniną) zbadano ekspresję  $\beta$ -kateniny na poziomie białka i mRNA. Technikę IHC zastosowano także do wykrywania E- i N-kadheryny, białek proliferacji komórkowej (Ki-67, cyklina D1) i wimentyny w wątrobie. Ocena półilościowa dotyczyła ekspresji antygenu Ki-67, cykliny D1 oraz wimentyny. Do analizy morfometrycznej białek adhezyjnych zastosowano Program Filtr HSV. Zanalizowano ponad 2000 obrazów mikroskopowych z pozytywną reakcją IHC. Wyniki uzyskane w analizie morfometrycznej eksportowano do formatu programu Microsoft Excel. Jako wynik przedstawiono wartości średniej ekspresji IHC danego białka adhezyjnego wyrażone w % reakcji na pole powierzchni mięszu wątroby. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica PL v. 9 oraz odpowiednich testów. Wyniki uznano za statystycznie istotne na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ .

U pacjentów z pzw C ekspresję  $\beta$ -kateniny wykazano w 96% bioptatów wątroby. Komórkowa lokalizacja dotyczyła zarówno błon komórkowych (31% chorych), jak i cytoplazmy hepatocytów oraz cholangiocytów (44% pacjentów). Mieszaną błonowo-cytoplazmatyczną lokalizację obserwowano w 25%. Nie obserwowano reakcji jądrowej na to białko. Analiza ilościowa wykazała najwyższą ekspresję  $\beta$ -kateniny w kontroli, kolejno w grupie z pzw C i najniższą w HCC. Ekspresja  $\beta$ -kateniny w grupie z pzw C nie różniła się jednak istotnie w porównaniu z kontrolą ( $p > 0,05$ ). Znamienne niższą ekspresję obserwowano natomiast w komórkach HCC zarówno w porównaniu z kontrolą, jak i grupą z pzw C ( $p < 0,05$  w obu przypadkach). Ekspresję E-kadheryny wykazano u 83% pacjentów z pzw C, 58% HCC i we wszystkich wątrobach kontrolnych. Znamienne najniższa

wykrywalność tego białka w wątrobie dotyczyła grupy z HCC i to zarówno w odniesieniu do kontroli, jak i pzw C. U pacjentów z pzw C komórkowa lokalizacja E-kadheryny dotyczyła w 56% błon komórkowych, w 18% cytoplazmy, a mieszaną lokalizację obserwowano w 26%. Ilościowa analiza ekspresji E-kadheryny wykazała znamienne niższy poziom ekspresji w grupie pzw C zarówno w stosunku do kontroli, jak i HCC ( $p < 0,05$ ). Najniższy indeks E-kadheryna/ $\beta$ -katenina wykazano u pacjentów z HCC. Różnice znamienne zanotowano w tej grupie w porównaniu z grupą z pzw C oraz kontrolą ( $p < 0,05$  w obu przypadkach). Ekspresję N-kadheryny wykryto w cytoplazmie hepatocytów u zaledwie 2/28 pacjentów z pzw C, u 10/59 pacjentów z HCC (błony +cytoplazma) oraz w 4/8 fragmentach wątroby kontrolnej (głównie błony komórkowe). Analiza ilościowa nie wykazała istotnych różnic w ekspresji N-kadheryny pomiędzy grupami. Porównując ekspresję 3 białek adhezyjnych w pzw C i HCC wykrywano najczęściej i pod względem ilościowym najwięcej  $\beta$ -kateniny, kolejno E-kadheryny i N-kadheryny. W grupie z pzw C nie wykazano istotnych różnic w ekspresji białek w różnie zaawansowanych zmianach histopatologicznych. W pzw C wykazano słabą pozytywną korelację pomiędzy ekspresją  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny. Nie obserwowano istotnych statystycznie zależności pomiędzy tkankową ekspresją badanych białek adhezyjnych czy wskaźnikiem E-kadheryna/ $\beta$ -katenina a danymi klinicznymi pacjentów z pzw C. U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV wykazano dość słabą negatywną korelację pomiędzy ekspresją E-kadheryny i ekspresją antygenu Ki-67. Ponadto w tej grupie obserwowano słabe pozytywne korelacje ekspresji Ki-67 z wiekiem pacjenta, *grading*, *staging* i stłuszczeniem narządu. Ani u pacjentów z pzw C, ani w kontroli nie obserwowano żadnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją białek adhezyjnych a ekspresją cykliny D1. Ekspresję białka wimentyny zlokalizowano w cytoplazmie nielicznych komórek zatok wątrobowych. Wykrywalność tego białka w biopsjach wątroby z zakażeniem HCV wynosiła 57%. Nasilenie ekspresji tego białka w wątrobie z pzw C ( $0,63 \pm 0,61$ ) nie różniło się od obserwowanego w kontroli ( $0,88 \pm 0,35$ ). Nie obserwowano istotnych zależności pomiędzy ekspresją białek adhezyjnych a ekspresją wimentyny czy ekspresją wimentyny a danymi klinicznymi pacjentów z pzw C. Na podstawie wyników badań sformułowano następujące wnioski: (1) Nieprawidłowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i rakiem wątrobowokomórkowym (HCC), wskazuje na zmiany strukturalne połączeń

międzykomórkowych w patologicznie zmienionym narządzie; (2) Dominacja niejądrowej lokalizacji badanych białek adhezyjnych ( $\beta$ -kateniny, E- i N-kadheryny) przy braku nadekspresji  $\beta$ -kateniny w wątrobie z długotrwałym przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i HCC, sugeruje obecność nieaktywnej transkrypcyjnie formy  $\beta$ -kateniny w badanym materiale tkankowym; (3) Z obu białek adhezyjnych kompleksu E-kadheryna/ $\beta$ -katenina, obniżona ekspresja E-kadheryny może być użytecznym wskaźnikiem zwiększonej proliferacji komórek wątrobowych i progresji przewlekłego zapalenia wątroby typu C; (4) Istotnie zmniejszona ekspresja E-kadheryny w wątrobie pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV i HCC w porównaniu z kontrolą, może stanowić wskaźnik przemiany nabłonkowo-mezenchymatycznej (EMT), nawet bez spodziewanych zmian w ekspresji N-kadheryny i wimentyny.



## SUMMARY

### **Role of cellular $\beta$ -catenin and E-cadherin expression as markers of progression in lesions of chronic hepatitis C**

HCV infection leads in 60-80% to development of chronic hepatitis, in 40% to advanced liver cirrhosis, in 60% cases to development of primary hepatic carcinoma. Mechanisms of primary hepatic carcinogenesis till now remain unclear.

In physiological conditions  $\beta$ -catenin plays a significant role in embryonal development of liver and in regeneration of the organ. In cell membrane of hepatocytes (mainly in its bilar pole)  $\beta$ -catenin in a complex with E-cadherin forms adhesive intercellular junctions.

On the other hand, in pathology  $\beta$ -catenin represents the central protein of the canonical Wnt/Fzd/ $\beta$ -catenin pathway and it may play role of an oncogen. Associations between disturbed genetic expression of the protein and intensity of cell proliferation involve mainly HCC of variable etiology and *hepatoblastoma*. Cellular expression of  $\beta$ -catenin was evaluated using various quantitative techniques, which do not always allow for an accurate comparison of the obtained results. Recently, the role of HCV proteins used to be accentuated (NS5A, protein C) in induction of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cell cultures. Until now, few results are available on the role of  $\beta$ -catenin and E-cadherin gene expression in chronic HCV infection *in vivo*.

The study aimed at: (1) Evaluation of cellular expression manifested by adhesion proteins,  $\beta$ -catenin and E-cadherin in livers of patients with chronic HCV infection (CH-C) and with hepatocellular carcinoma (HCC), as related to selected markers of cell proliferation, histological lesions and clinical data; (2) Evaluation of cellular expression manifested by N-cadherin and vimentin as selected indicators of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in livers of patients with chronic C or HCC; (3) Determination of the role played by tissue expression of  $\beta$ -catenin, E- and N-cadherin in progression of chronic type C hepatitis.

The investigated group included patients with CH-C with documented long-term HCV infection ( $\geq 20$  years) (n=63). All the patients manifested positive HCV-specific antibodies (HCV version 3.0 AXYM System, Abbott) and presence of HCV RNA in serum (AMPLICOR HCV<sup>TM</sup> test, version 2.0 (ROCHE, Mannheim, Germany; test sensitivity of 600 IU/ml) and they were not infected with other hepatotropic viruses (HBV, HCMV, EBV, HIV-1). Other causes of chronic hepatitis were excluded (deficiency of  $\alpha_1$ -antitrypsin,

Wilson's disease, alcoholic disease). Liver biopsies were performed in years of 2005-2010 within histopathological diagnosis before antiviral treatment. Fragments of livers with HCC originated from a tissue panel (Cybrdi Inc.; Maryland, USA, n=57) and from archival paraffin blocks with HCC (n=4). The control material (n=8) involved fragments of a HCV-negative liver. The tissue material was evaluated following routine staining with hematoxylin and eosin, silver impregnation and using the trichromic Mallory's technique. Intensity of inflammatory lesions (grading) and advancement of fibrosis (staging) were evaluated using the scoring scale according to METAVIR. Using the immunocytochemical techniques (the detection systems of *new polymer-based IHC*, ImmunoMax technique) and *in situ* hybridization (digoxigenin-labelled probes) expression of  $\beta$ -catenin was examined at the level of protein and mRNA. IHC technique was also used for detection of E- and N-cadherin, cell proliferation proteins (Ki-67, cyclin D1) and of vimentin in liver. The semi-quantitative evaluation pertained expression of Ki-67 antigen, cyclin D1 and vimentin. Morphometric analysis of adhesion proteins took advantage of Filtr HSV software. Over two thousand microscopic images with positive IHC reaction were analysed. Results obtained in the morphometric analysis were exported to the Microsoft Excell software format. The results were presented as mean IHC expression of a given adhesion protein, expressed in the share (%) manifested by the reaction per area of hepatic parenchyma. The statistical analysis was conducted using the Statistica PL v. 9 software and appropriate tests. The results were accepted as significant at the threshold of  $p \leq 0.05$ .

In patients with CH-C expression of  $\beta$ -catenin was demonstrated in 96% liver biopsies. Its cellular location involved cell membranes (31% patients), cytoplasm of hepatocytes and cholangiocytes (44% patients). A mixed membranous/cytoplasmic localization was detected in 25%. No nuclear reaction was detected in reaction for the protein. Quantitative analysis demonstrated the highest expression of  $\beta$ -catenin in the control, followed by CH-C and it was least pronounced in HCC. However, expression of  $\beta$ -catenin in the group with CH-C manifested no significant difference in comparison with the control ( $p > 0.05$ ). On the other hand, a significantly lower expression was detected in HCC cells, both as compared to the control and as compared to CH-C ( $p < 0.05$  in either case). Expression of E-cadherin was demonstrated in 83% patients with CH-C, 58% patients with HCC and in all control livers. The least pronounced detectability of the liver protein was documented in the group with

HCC, both as related to the control and to patients with CH-C. In patients with CH-C cellular localization of E-cadherin comprised in 56% cell membranes, in 18% cytoplasm while a mixed localization was detected in 26% of the cases. Quantitative analysis of E-cadherin expression demonstrated its significantly lower level in the group of CH-C as related to the control and as compared to HCC ( $p < 0.05$ ). The lowest E-cadherin/ $\beta$ -catenin index was demonstrated in patients with HCC. In the group significant differences were detected as compared to the group with CH-C and as compared to the control ( $p < 0.05$  in either case). Expression of N-cadherin was detected in hepatocyte cytoplasm in just 2/28 patients with CH-C, in 10/59 patients with HCC (cell membranes + cytoplasm) and in 4/8 fragments of control liver (mainly in cell membranes). Quantitative analysis demonstrated no significant differences between the groups in expression of N-cadherin. Comparison of expressions manifested by three adhesion proteins in CH-C and HCC showed that  $\beta$ -catenin was detected most frequently and in the highest quantities, followed by E-cadherin and, then, by N-cadherin. In the group of CH-C no significant differences were detected in expression of the proteins between histological lesions manifesting various advancement stages. In CH-C a weakly pronounced positive correlation was shown between expressions of  $\beta$ -catenin and E-cadherin. No significant relationships could be detected between tissue expression of studied adhesion proteins or E-cadherin/ $\beta$ -catenin index and clinical data of the patients with CH-C. In patients with chronic HCV infection a relatively weak negative correlation was detected between expression of E-cadherin and expression of Ki-67 antigen. Moreover, in the group weakly pronounced positive correlations were detected between expression of Ki-67 on one hand and patient's age, grading, staging and fatty degeneration of the organ on the other. Neither in patients with CH-C nor in the control significant relationships could be demonstrated between expression of adhesion proteins and expression of cyclin D1. Expression of vimentin protein was located in cytoplasm of few cells of liver sinuses. In biopsies of HCV-infected livers the protein was detected in 57% cases. Intensity of the protein expression in livers with chronic C ( $0.63 \pm 0.61$ ) did not differ from that observed in the control ( $0.88 \pm 0.35$ ). No significant relationships were detected between expression of adhesion proteins and expression of vimentin or between expression of vimentin and clinical data in CH-C patients.

The results permitted to formulate the following conclusions: (1) Abnormal localization of  $\beta$ -catenin and E-cadherin in livers of patients with chronic HCV infection or hepatocellular carcinoma (HCC) points to structural lesions in intercellular junctions in the pathologically altered organ; (2) Prevalence of non-nuclear localization manifested by the studied adhesion proteins ( $\beta$ -catenin, E- and N-cadherin) accompanied by lack of overexpression of  $\beta$ -catenin in livers with long-term chronic hepatitis C and HCC suggests presence of transcriptionally inactive form of  $\beta$ -catenin in the studied tissue material; (3) Among the two adhesion proteins of E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex, the lowered expression of E-cadherin may provide a useful index of an increased hepatocyte proliferation and progression of chronic hepatitis C; (4) a significantly decreased expression of E-cadherin in livers of patients with chronic HCV infection and HCC, as compared to the control, may represent an index of the epithelial-mesenchymal transition (EMT), even in the absence of expected changes in expression of N-cadherin and vimentin.

**Tabela 2A.** Dane kliniczne pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV (grupa badana).

Nr pacjenta	Wiek (lata)	pleć	Czas trwania zakażenia (lata)	Genotyp HCV	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	ALT (U/l)	AST (U/l)	GGT P (U/l)	AFP (ng/ml)	HCV RNA (IU/l)	Białko całk. (g/dl)	Alb. (g/dl)	γ-glob. (g/dl)	Płytki krwi (G/l)	Cholesterol (mg/dl)	G*	S*	Stt.*
1	56	m	44	1a+1b	23,9	97	72	51	7,22	177000	6,63	2,98	1,66	222	179	2	2	5
2	30	m	25	1b	25,48	67	55	29	1,46	796000	6,12	3,35	1,07	236	134	2	1	0
3	23	k	20	1b	18,38	100	72		1,53	44000	7,4	4,27	1,54	204		2	1	0
4	30	k	30	1b	21,27	18	21	14	1,3	91400	7,4	4,22	1,21	319		2	1	0
5	43	m	22	1b	37,61	75	29	62	3,61	1230000	7,4	3,7	1,48	171	134	1	1	30
6	41	m	41	1b	25	59	37,3	97	5,3	1400	6,02	3,01	1,26	190	222	1	1	0
7	51	m	19	1b	25,89	67,5	55,3	29	2,47	225000	6,97	3,34	1,6	262	251,89	1	1	5
8	30	k	7	1b	19,09	59	39		2,08	1890	7,42	3,63	1,55	271	213	1	1	0
9	32	m		1b	23,79	292	182	122	2,93	13300	6,82	3,75	1,23	207	135	2	2	0
10	55	k	30	1b	27,93	84,8	62	70,1	11,54	10700	6,66	3,53	1,19	245	193,51	2	2	5
11	19	k		1b	24,69	40	32	11,9	2,94	11600	6,25	3,56	1	327	186	1	0	0
12	23	m		1b	26,63	43,6	31,9	13,4	2,51	1340000	7,41	3,7	1,85	167	224,91	1	1	0
13	28	k		4a/4c/4d	24,49	51,5	37,2	24	4,24	8880	7,75	4,03	1,55	372	192,17	1	1	0
14	52	k		1b	21,52	80,2	54,5	69,3	4,96	10100	7,82	3,99	2,03	161	205,08	2	2	0
15	36	m		1b	26,46	129,7	68,9	128	3,16	4530	7,4	3,85	1,41	133	224,41	2	2	10
16	49	k		1b	22,49	37,55	62,1	90	38,44	2510000	8,68	4,08	2,26	233	248	3	3	2
17	26	k		1b	24,22	34,93	32,4		2,62	36300	6,39	3,45	1,15	184	190	2	2	0
18	63	k		1b	29,78	193,6	168	67	6,73	524000	7,88	3,94	1,97	229	128,55	3	4	50
19	19	m		1b	24,48	51,99	45,5	31,9	2,32	4700	7,75	4,26	1,15	432	180,21	1	1	0
20	55	m		1b	23,63	251,35	137,6	80,5	9,98	177000	7,06	3,6	1,48	135	158	3	3	5
21	18	k		1b	19,38	69,68	41,4	14	2,95	37500	8,04	4,1	1,93	287	152,34	1	1	0
22	51	k	22	1b	24,73	24,98	23,8	42,2	3,85	427000	7,07	3,96	0,99	316	205,67	1	1	0
23	50	m		1b	23,38	55,3	53,5	21	3,01	298000	6,5	3,64	0,84	211		2	1	0
24	23	m		1b	19,74	124,9	94,8		11,12	1830000	6,13	3,06	1,23	143	144,1	2	1	0
25	30	m		1b	25,24	86,5	64,5		2,35	5790	6,99	3,77	1,61	192		2	1	0
26	30	k		1a	18,07	51,8	29,3		1,71	45900	7,37	3,68	1,55	269	178,3	1	1	2

27	30	m		4a/4c/4d	26,54	165,1	73,9		3,72	47000	7,01	3,5	1,61	252		2	1	70
28	19	k		1b	22,49	33,6	31,8		2,68	960000	7,21	4,25	1,23	208	231,4	1	1	0
29	30	k	18	1	23,11	37,2	25,4		1,72	2480000	7,95	4,05	2,07	189	187,6	2	2	0
30	32	m	22	1b	28,65	44,5	30,8		5,21	120000	7,74	4,33	1,24	178		2	3	0
31	62	k	25	1b	21,71	57	40,2		4,75	678000	6,46	3,62	1,23	115		2	2	30
32	22	m		1a	21,57	191,6	119,5		1,93	8430	8,01	4,16	1,68	202		2	2	5
33	47	m	20	1b	26,73	27,6	24,3		5,15	629000	7,58	4,09	1,29	283		1	1	3
34	47	m	27	1b	31,17	93,3	50,2	78,3	6,63	21500000	6,92	4,26	0,95	217	191,9	2	1	0
35	31	k	25	1b	17,8	78,8	49,4		2,2	1220	7,5	4,65	1,33	271	217,9	1	1	0
36	25	k	25	1b	21,81	19,6	15,7	14,1	7,34	10500	7,06	4,47	0,88	282	157,1	1	1	0
37	23	k		4a/4c/4d	22,42	39	28	32	2,22	39000	6,35	4,07	0,94	180	164	1	2	5
38	57	k	12	1b	29,87	75	128	84	11,4	448000	6,97	3,83	1,81	139	194	3	4	50
39	20	m	19	1b		37	29	25	2,61	33400	6,39	3,83	1,15	205	154	1	1	0
40	72	m														3	3	20
41	48	m		1b		102	104	56	3,31	5050000	7,7		1,98	77	140	3	2	10
42	27	k														3	4	20
43	24	m				38	24	18			7,1		0,86	186	153	1	1	20
44	60	m	14	1b	28	100	57	63	6,02	44200	7,6	3,9	1,69	204	183	3	4	10
45	55	m	19	1b	27,19	85	105	126	5,13	4090	6,5	3,44	1,62	139	102	3	1	10
46	34	m		3a		134	74	47	1,37	9140000	6,6		1,47	176	196	1	1	70
47	54	m	30	1b	32,05	150	83	74	7,55	59000	7,9	3,79	1,42	180	190	1	3	10
48	65	m	14	4c/4d	21,37	79	123	140	67,04	89700	6,2	2,79	1,61	124	151	2	4	0
49	37	m		1b	26	261	114	41	3,61	1200000	6,8		0,94	110	113	3	2	20
50	53	m		1b		120	62	137	9,98	13500	6,9	4,28	0,96	113	167	3	4	50
51	27	m	27	1a	24,29	36	28	37	1,63	291000	9,6	5,66	1,63	222	170	1	1	0
52	19	k	19	1b		22	18	6	3,91	272000	7,7	3,92	1,46	232	233	1	1	10
53	29	k	9	1b	20,11	44	24	29	2,06	1750000	7,7	4	1,54	300	222	2	1	30
54	25	k		3a		67	41	22	1,76	941	8,1		1,78	208	190	2	2	20
55	59	k	25	1b	26,83	43	32	59	4,19	4960	7,1	3,62	1,49	322	274	2	1	30
56	28	m		1b	24,17	31	25	22	6,12	2810000	7,5	4,35	1,5	270	177	1	1	10

57	41	m		3a		99	42	61	4,53	86900	6,7		1,21	192	168	2	0	30
58	25	k	25	1b	20,61	29	22	27	2,69	105000	6,8	3,67	1,43	232	150	1	1	10
59	19	m	17	1b	19,8	38	39	51	2,34	61900	7,8	4,29	1,87	328	154	1	1	0
60	40	k	21	1b		43	34	24	6,14	11400	6,6	3,89	1,12	213	139	1	1	0
61	24	k	24	1b		51	42	17	2,39	2030	8,3		1,9	228	99	2	1	10
62	44	k	44	1b	20,9	169	145	68	10,13	438000	7,5	3,82	1,65	102	122	2	4	10
63	44	k	44	1b	24,5	63	67	50,6	6,51	334000	7,5	3,82	1,57	134	144	3	3	0

**Objaśnienia:** **BMI** (body mass index) – indeks masy ciała; **AFP** - (alpha-fetoprotein) – alfa-fetoproteina; **Alb.** – albuminy; **ALT** (alanine aminotransferase) - aminotransferaza alaninowa; **AST** (aspartate aminotransferase) - aminotransferaza asparaginianowa; **GGTP** (gamma-glutamyl transpeptidase) - gamma-glutamyl-transpeptydaza; **G (Grading)** – aktywność zapalna; **HCV** – hepatitis C virus; **S (Staging)** – zaawansowanie włóknienia; **Stł.** – stłuszczenie wątroby średnim wyrażone odsetkiem komórek z cechami zwyrodnienia tłuszczowego; \* - parametry ocenione w skalach półilościowych (p. Materiał i Metody).

**Tabela 2B.** Dane kliniczne pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym (HCC).

<b>Nr pacjenta</b>	<b>Wiek (lata)</b>	<b>pleć</b>	<b>GRADE</b>
1	43	m	II
2	39	m	III
3	55	k	II
4	32	k	II
5	63	m	II
6	37	k	II
7	38	m	II
8	52	k	II
9	48	m	II
10	49	m	I
11	43	m	III
12	36	m	I
13	45	m	II
14	71	m	II
15	43	k	II
16	52	m	III
17	49	m	II
18	63	m	II
19	63	k	I
20	46	m	II
21	48	m	II
22	49	m	II
23	48	m	II
24	43	k	II
25	67	m	II
26	63	m	II
27	60	m	II
28	56	m	II
29	43	m	II
30	58	m	II
31	50	m	II
32	35	m	II
33	61	m	II



34	50	m	III
35	62	k	I
36	39	m	II
37	67	m	II
38	37	k	II
39	62	m	III
40	50	m	I
41	41	m	III
42	47	k	III
43	35	m	II
44	47	m	II
45	56	m	II
46	46	m	I
47	77	m	II
48	64	m	III
49	35	m	III
50	98	k	II
51	69	k	II
52	58	m	I
53	62	m	II
54	53	m	II
55	47	m	III
56	55	m	III
57	57	m	II
58	31	m	II
59	75	m	I
60	31	k	
61	20	m	II

*Objaśnienia: k- kobieta, m –mężczyzna*

**Tabela 2C.** Dane kliniczne pacjentów z grupy kontrolnej.

<b>Nr pacjenta</b>	<b>Wiek (lata)</b>	<b>płeć</b>
1	71	k
2	72	m
3	35	m
4	31	m
5	20	m
6	66	k
7	55	m
8	60	m

*Objaśnienia: k- kobieta, m –mężczyzna*

## PIŚMIENNICTWO

---

- <sup>1</sup> Choo QL, Kuo G, Welner AJ, Overby LR, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244(4902):359-62.
- <sup>2</sup> Boroń-Kaczmarska A, Cianciara J, Gładysz A, Gonciarz Z, i wsp. Stanowisko grupy ekspertów w dziedzinie chorób zakaźnych dotyczące leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C. *Med Sci Mon* 2003;9(6):1-2.
- <sup>3</sup> European Association for the study of the liver. EASL Clinical Practise Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011;55:245-64.
- <sup>4</sup> Bush MP, Kimberly A, Shafer P. Acute-phase hepatitis C virus infection: implications for research, diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis* 2005;40(7):959-61.
- <sup>5</sup> Juszczyk J. Hepatitis C: patogenez a i terapia. Termedia, Poznań 2009:14.
- <sup>6</sup> Czerpiel J, Biesiada G, Mach T. Wirusowe zapalenie wątroby typu C. *Pol Arch Med Wewn* 2008;118(12):734-40.
- <sup>7</sup> Jabłońska J, Ząbek J, Madaliński K, Godzik P. Pozawątrobowe objawy zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C. *Reumatologia* 2009;47(6):364-67.
- <sup>8</sup> Wakita T, Pietschman T, Kato T, Date T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11(7):791-6.
- <sup>9</sup> Działo J, Deptuła W. Systematyka wirusów kręgowców - aktualne dane. *Kosmos* 2010;59(288-289):435-49.
- <sup>10</sup> Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology* 2011;8:160.
- <sup>11</sup> Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997;78(Pt10):2397-410.
- <sup>12</sup> Nitkiewicz J. Epidemiologia molekularna wirusa przewlekłego zapalenia wątroby typu C (HCV). *Przegl Epidemiol* 2004;58(3):413-21.
- <sup>13</sup> Bartenschlager R, Lohman V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81(7):1631-48.
- <sup>14</sup> Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, et al. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004;85:451-61.
- <sup>15</sup> Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, et al. Inhibition of RIG-1-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 2005;79(7):3969-78.
- <sup>16</sup> Schinkel J, Spaan WJM, Kroes ACM. Meta-analysis of mutations in the NS5A gene and hepatitis C virus resistance to interferon therapy: uniting discordant conclusions. *Antivir Ther* 2004;9(2):275-86.
- <sup>17</sup> Simonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-9.
- <sup>18</sup> Juszczyk J. Hepatitis C: patogenez a i terapia. Termedia, Poznań 2009:6.
- <sup>19</sup> Kamińska A, Bednarska A, Radkowski M. Pozawątrobowa replikacja wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). *Przegl Epidemiol* 2003;57:317-20.
- <sup>20</sup> Dąbrowska MM, Panasiuk A, Flisiak R. Mechanizm wejścia wirusa HCV jako nowy cel leczenia przewlekłych zapaleń wątroby typu C. *Pol Merk Lek* 2009;27:140-143.
- <sup>21</sup> Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yamauchi T, et al. Role of Toll-Like receptors in hepatitis C virus infected chronic liver disease. *Hepatology* 2006;44(Suppl.1):300A, Abstr. 296

- 
- <sup>22</sup> Chang SS, Szabo G. TLR2 co-receptors, TLR1 and TLR6, selectively participate in TLR2 innate immune activation by HCV core and NS3 proteins. *Hepatology* 2006;44(Suppl.1):293A, Abstr. 278.
- <sup>23</sup> Błach-Olszewska Z. Mechanizmy odporności wrodzonej. *Postępy Hig Med Dośw* 2005;59:250-58.
- <sup>24</sup> Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195(1):35-41.
- <sup>25</sup> Yoon JC, Shiina M, Ahlenstiel G, Rehmann B. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology* 2009;49(1):12-21.
- <sup>26</sup> Kawamura T, Takeda K, Mendiratta KS, Kawamura H, et al. Critical role of NK1 T Cells in IL-12 induced immune responses in vivo. *J Immunol* 1998;160(1):16-19.
- <sup>27</sup> Tseng CTK, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR. Characterization of liver T cell receptor  $\gamma\delta$  T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 2001;33(5):1312-20.
- <sup>28</sup> Kopeć-Szlęzak J. Biologia komórek dendrytycznych. *Onkol Pol* 2008;11(3):106-10.
- <sup>29</sup> Thomson AW, Drakes ML, Zahorchak AF, O'Connell PJ, et al. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):322-30.
- <sup>30</sup> Żeromski J, Samara H, Mozer-Lisewska I. Komórki dendrytyczne: czy wszystko o nich wiemy? *Post Biol Kom.* 2007;34(3):541-56.
- <sup>31</sup> Albert ML, Decalf J, Pol S. Plasmacytoid dendritic cells move down on the list of suspects: in search of the immune pathogenesis of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008;49(6):1069-78.
- <sup>32</sup> Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, et al. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 2005;128(4):1034-41.
- <sup>33</sup> Gale MJr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005;436(7053):939-45.
- <sup>34</sup> Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-1 antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437(7062):1167-72.
- <sup>35</sup> Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Tola D, et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006;44(1):126-39.
- <sup>36</sup> Juszczak J. Hepatitis C: patogenez i terapia. Termedia, Poznań 2009:29.
- <sup>37</sup> Aberle JH, Formann E, Steindl-Munda P, Weseslindtner L, et al. Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol* 2006;36(1):24-31.
- <sup>38</sup> Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169(6):3447-58.
- <sup>39</sup> Billerbeck E, Böttler T, Thimme R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2007;13(36):4858-64.
- <sup>40</sup> Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, et al. Rapid Induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(14):6025-30.
- <sup>41</sup> Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288(5464):339-44.

- 
- <sup>42</sup> Nitkiewicz J. Przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C - mechanizmy "ucieczki immunologicznej" wirusa. *Przeegl Epidemiol* 2004;58(3):423-33.
- <sup>43</sup> Sansonno D, Lotesoriere C, Cornacchiulo V, Fanelli M, et al. Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood* 1998;92(9):3328-37.
- <sup>44</sup> Cielecka-Kuszyk J, Pawłowska J. Badanie histopatologiczne w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby: klasyfikacja, określenie stopnia aktywności, zmian zapalnych i włóknienia. *Hepatol Pol* 1997;4(1):37-41.
- <sup>45</sup> Cianciara J, Jabłońska J, Horban A, Walewska-Zielecka B. Ognisko ostrego wirusowego zapalenia wątroby typu C-przebieg kliniczny obraz histopatologiczny i skuteczność terapii. *Przeegl Epidemiol* 2005;59(2):385-94.
- <sup>46</sup> Kasprzak A, Biczysko W, Adamek A, Zabel M. Morphological lesions detected by light and electron microscopies in chronic type C hepatitis. *Pol J Pathol* 2003;54(2):129-42.
- <sup>47</sup> Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1(5):431-5.
- <sup>48</sup> Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93.
- <sup>49</sup> Walewska-Zielecka B. Współczesne zasady klasyfikacji przewlekłych zapaleń wątroby i elementy diagnostyki etiopatologicznej w badaniach morfologicznych. *Post N Med* 2000;1:18-26.
- <sup>50</sup> Stolarczyk J. Wartość ilościowej biopsji wątroby w PZW (przewlekłe zapalenie wątroby) B i C. *Warsztaty Hepatologiczne. Bielsko-Biała 2001.*
- <sup>51</sup> Gabriel A, Miętkiewski J, Stolarczyk J, Szczepański W, et al. Zalecane zasady pobierania i oceny histopatologicznej bioptatów wątroby (Standardy Polskiego Towarzystwa Patologów). *Warsztaty Hepatologiczne. Bielsko-Biała 2001.*
- <sup>52</sup> Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134(6):1655-69.
- <sup>53</sup> Friedmann SL. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology* 2008;254(3):120-9.
- <sup>54</sup> Kasztelan-Szczerbińska B, Słomka M, Daniluk J, Celiński K, et al. Komórki gwiazdziste jako główny regulator sygnalizacji międzykomórkowej w procesie włóknienia wątroby. *Post N Med* 2010;23(1):69-74.
- <sup>55</sup> Bréchot C, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, et al. Impact of HBV, HCV and GBV-C/HGV on hepatocellular carcinomas in Europe:result of a European concerted action. *J Hepatol* 1998;29(2):173-83.
- <sup>56</sup> Terada T, Ueda K, Nakanuma Y. Histopathological and morphometric analysis of atypical adenomatous hyperplasia of human cirrhotic livers. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;422(5):381-8.
- <sup>57</sup> Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19(3):235-42.
- <sup>58</sup> Edamoto Y, Hara A, Biernat W, Terracciano L, et al. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer* 2003;106(3):334-41.
- <sup>59</sup> Kasprzak A, Adamek A. Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. *Hepatol Res* 2008;38(1):1-26.
- <sup>60</sup> Lu W, Lo SY, Chen M, Wu KJ, et al. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264(1):134-41.

- 
- <sup>61</sup> Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272(17):10983-6.
- <sup>62</sup> Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F, Merlo P, et al. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003;22(17):2573-80.
- <sup>63</sup> Cho JW, Baek WK, Yang SH, Chang J, et al. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 2001;1538(1):59-66.
- <sup>64</sup> Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, et al. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf 1/Cip 1/Sdi 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273(2):479-84.
- <sup>65</sup> Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun ACS, et al. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 2000;19(4):729-40.
- <sup>66</sup> Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, et al. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem* 1998;273(28):17651-9.
- <sup>67</sup> Lee SW, Lee MH, Park JH, Kanq SH, et al. SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage. *EMBO J* 2012;31(23):4441-52.
- <sup>68</sup> Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1999;274(22):15751-56.
- <sup>69</sup> Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74(4):1736-41.
- <sup>70</sup> Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72(5):3691-7.
- <sup>71</sup> Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, Toné S, et al. Inhibition of cytochrome C release in Fas mediated signal pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 2001;276(15):12140-6.
- <sup>72</sup> Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Briaciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106(10):1239-49.
- <sup>73</sup> Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the hepatitis C virus(HCV) core protein. *Oncogene* 2001;20(20):2606-10.
- <sup>74</sup> Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Häussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in HepG2 Tet off cell line. *Virology* 2002;292(2):272-84.
- <sup>75</sup> Tai DI, Tsai SL, Chen YM, Chuang YL, et al. Activation of nuclear factor kappa B in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000;31(3):656-64.
- <sup>76</sup> Joo M, Hahn Y, Kwon M, Sadikot RT, et al. Hepatitis C virus core protein suppresses NF κB activation and cyclooxygenase 2 expression by direct interaction with IκB kinase β. *J Virol* 2005;79:7648-57.
- <sup>77</sup> Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, et al. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology* 2005;41(5):1096-105.

- 
- <sup>78</sup> Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, et al. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF  $\beta$  pathway. *Oncogene* 2005;24(40):6119-32.
- <sup>79</sup> Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral related steatosis. *FASEB J* 2002;16(2):185-94.
- <sup>80</sup> Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285(5424):107-10.
- <sup>81</sup> Tsenq CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD 81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195(1):43-50.
- <sup>82</sup> Zhao LJ, Wang L, Ren H, Cao J, et al. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res* 2005;305(1):23-32.
- <sup>83</sup> Ishido S, Hotta H. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett* 1999;438(3):258-62.
- <sup>84</sup> Borowski P, Kühn R, Laufs R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol* 1999;13(1-2):61-9.
- <sup>85</sup> Foy E, Li K, Wang C, Sumpter JrR, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300(5622):1145-8.
- <sup>86</sup> Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter JrR, Wang C, et al. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(7):4650-5.
- <sup>87</sup> Polyak SJ, Khabar KSA, Paschal DM, Ezelle HJ, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75(13):6095-106.
- <sup>88</sup> Tu H, Gao L, Shi ST, Taylor DR, Yang T, Mircheff AK, et al. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with SNARE-like protein. *Virology* 1999;263(1):30-41.
- <sup>89</sup> Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, et al. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292(2):198-210.
- <sup>90</sup> Chung KM, Lee J, Kim JE, Song OK, et al. Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin beta3. *J Virol* 2000;74(11):5233-41.
- <sup>91</sup> Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, et al. Hepatitis C virus NS5 A protein interacts with and negatively regulates the non receptor protein tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* 2008;89(5):1231-42.
- <sup>92</sup> Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R. The amino terminal deletion mutant of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236(2):360-364.
- <sup>93</sup> Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, et al. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270(2 ):476-87.
- <sup>94</sup> Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and P53, inhibiting their DNA binding and p53 interaction with TBP and ERCC3. *Biochem Biophys Acta Mol Cell Res* 2002;1599 (2):193-204.
- <sup>95</sup> Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, et al. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21(31):4801-11.
- <sup>96</sup> Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, et al. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3

---

domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(10):5533-8.

<sup>97</sup> Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, et al. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. J Biol Chem 2001;276(16):12675-84.

<sup>98</sup> Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. J Biol Chem 2004;279(13):12232-41.

<sup>99</sup> Milward A, Mankouri J, Harris M. Hepatitis C Virus NS5A protein interacts with  $\beta$ -catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase dependent fashion. J Gen Virol 2010;91(Pt2):373-81.

<sup>100</sup> Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress and activates STAT3 and NF $\kappa$ B. Proc Nat Acad Sci USA 2001;98(17):9599-604.

<sup>101</sup> Inestrosa NC, Montecinos-Oliva C, Fuenzalida M. Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. J Neuroimmune Pharmacol 2012;7(4):788-804.

<sup>102</sup> Canalis E. Wnt signaling in osteoporosis mechanism and novel therapeutic approaches. Nat Rev Endocrinol 2013;9(4):575-88.

<sup>103</sup> Koziński K, Dobrzyń A. Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki. Post Hig Med Dosw. 2013;67:1098-1108.

<sup>104</sup> Lamparska-Przybysz M, Wieczorek M, Majorek M, Guzenda P. Rola szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina w molekularnym mechanizmie procesów nowotworowych. Wspolcz Onkol 2006;10:497-501.

<sup>105</sup> Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, et al. A new nomenclature for *int-1* related genes: The Wnt gene family. Cell 1991;64(2):231R

<sup>106</sup> Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, et al. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to segment polarity gene *wingsless*. Cell 1987;50(4):649-57.

<sup>107</sup> Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon: functions and mechanisms of  $\beta$  catenin independent Wnt signaling. Dev Cell 2003;5(3):367-77.

<sup>108</sup> Nollet F, Berx G, Molemans F, van Roy F. Genomic organization of the human  $\beta$ -catenin gene (CTNNB1). Genomics 1996;32:413-24.

<sup>109</sup> McCrea PD, Turc CW, Gumbiner B. A homolog of armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. Science 1991;254(5036):1359-61.

<sup>110</sup> Peifer M, Berg S, Reynolds AB. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. Cell 1994;76(5):789-91.

<sup>111</sup> Huber AH, Weis WI. The structure of the  $\beta$ -catenin/E-cadherin complex and molecular basis of diverse ligand recognition by  $\beta$ -catenin. Cell 2001;105(3):391-402.

<sup>112</sup> Du SJ, Purcell MS, Christian JL, McGrew LL, Moon RT. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wide-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. Mol Cell Biol 1995;15(5):2625-34.

<sup>113</sup> Komekado H, Yamamoto H, Chiba T, Kikuchi A. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. Gen Cells 2007;12(4):521-34.

<sup>114</sup> Hausmann G, Bänziger C, Basler K. Helping Wingless take flight: how Wnt proteins are secreted. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8(4):331-6.

<sup>115</sup> Zhao Z, Lee CC, Baldini A, Caskey CT. A human homologue of Drosophila polarity gene *frizzled* has been identified and mapped to 17q 21.1. Genomics 1995;27(2) 370-3.



- 
- <sup>116</sup> Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, et al. LDL-receptor related proteins in Wnt signaling transduction. *Nature* 2000;407(6803):530-5.
- <sup>117</sup> Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, et al. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000;407(6803):527-30.
- <sup>118</sup> Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and Wnt signal inhibitor. *J Biol Chem* 2005;280(29):26770-5.
- <sup>119</sup> Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116(Pt13):2627-34.
- <sup>120</sup> Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004;116(6):883-95.
- <sup>121</sup> MacDonald BT, Yokota C, Tamai K, Zeng X, He X. Wnt signal amplification via activity cooperativity and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptors LRP6. *J Biol Chem* 2008;283(23):16115-23.
- <sup>122</sup> Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, et al. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor LRP 6 phosphorylation/activation via frizzled, disheveled and axin function. *Development* 2008;135:367-75.
- <sup>123</sup> Keith A, Wharton Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 2003;253(1):1-17.
- <sup>124</sup> Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, et al. Control of  $\beta$ -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108(6):837-47.
- <sup>125</sup> Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, et al. The ankyrin repeat protein Diversin recruits casein kinase I $\epsilon$  to the  $\beta$ -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev* 2002;16(16):2073-84.
- <sup>126</sup> Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/ $\beta$ -catenin signaling. *Science* 2007;316(5827):1043-6.
- <sup>127</sup> Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/ $\beta$ -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:1130-4.
- <sup>128</sup> Lusting B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/Axin 2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 2002;22(4):1184-93.
- <sup>129</sup> Spink KE, Polakis P, Weis WI. Structural basis of the Axin – adenomatous polyposis coli interaction. *EMBO J* 2000;19(10):2270-9.
- <sup>130</sup> Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. Nuclear export of the APC tumor suppressor controls  $\beta$ -catenin function in transcription. *EMBO J* 2003;22(5):1101-13.
- <sup>131</sup> Henderson BR, Fagotto F. The ins and outs of APC and  $\beta$ -catenin nuclear transport. *EMBO Reports* 2002;3(9):834-9.
- <sup>132</sup> Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of  $\beta$ -catenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(9):2882-7.
- <sup>133</sup> Hendriksen J, Fagotto F, van der Velde H, van Schie M, et al. RanBP3 enhances nuclear export of active (beta) - catenin independently of CRM1. *J Cell Biol* 2005;171(5):785-97.
- <sup>134</sup> Kriehhoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* 2006;119(Pt7):1453-63.
- <sup>135</sup> Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, et al. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 2008;133(2):340-53.

- 
- <sup>136</sup> Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling variety at the core. *J Cell Sci* 2007;120(Pt3):385-93.
- <sup>137</sup> Bronties H, Roose J, van De Watering M, Clevers H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucl Acids Res* 2001;29(7):1410-9.
- <sup>138</sup> Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 2002;109(1):47-60.
- <sup>139</sup> Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta catenin in vertebrates. *Embo J* 2000;19(8):1839-50.
- <sup>140</sup> Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, et al. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 2001;20(17):4935-43.
- <sup>141</sup> Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, Jones KA. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt Target genes. *Genes Dev* 2006;20(5):586-600.
- <sup>142</sup> Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell* 2006;125(2):327-41.
- <sup>143</sup> Hecht A, Litterst CM, Huber O, Kemler R. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein *in vitro*. *J Biol Chem* 1999;274(25):18017-25.
- <sup>144</sup> Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, et al. Pontin52 and reptin 52 function as antagonistic regulators of beta -catenin signalling activity. *EMBO J* 2000;19(22):6121-30.
- <sup>145</sup> Hamada F, Bienz M, The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF. *Dev Cell* 2004;7(5):677-85.
- <sup>146</sup> Valenta T, Lukas J, Korinek V. HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31(9):2369-80.
- <sup>147</sup> Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
- <sup>148</sup> He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281(5382):1509-12.
- <sup>149</sup> Tetsu O, McCormick F.  $\beta$ -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398(6726):422-26.
- <sup>150</sup> van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, et al. The  $\beta$ -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111(2):241-50.
- <sup>151</sup> Sellin JH, Umar S, Xiao J, Morris AP. Increased  $\beta$ -catenin expression and nuclear translocation accompany cellular hyperproliferation *in vivo*. *Cancer Res* 2001;61(7):2899-906.
- <sup>152</sup> Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003;362(9379):205-9.
- <sup>153</sup> Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, et al. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis as a novel downstream target of the  $\beta$ -catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res* 2003;63(19):6116-20.
- <sup>154</sup> Boon EM, van der Neut R, van der Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002;62(18):5126-28.
- <sup>155</sup> Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001;61(16):6050-4.

- 
- <sup>156</sup> Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* 2002;122(1):60-71.
- <sup>157</sup> Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, et al. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 1999;154(2):515-23.
- <sup>158</sup> Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, et al. Nr-CAM is a target gene of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* 2002;16(16):2058-72.
- <sup>159</sup> Hlubek F, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T.  $\beta$ -catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 $\gamma$ 2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004;108(2):321-6.
- <sup>160</sup> Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, et al. Activation of the  $\beta$ -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 1998;58(12):2524-7.
- <sup>161</sup> Bläker H, Hoffmann WJ, Rieker RJ, Penzel R, et al. Beta-catenin accumulation and mutation of the CTNNB1 gene in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(4):399-402.
- <sup>162</sup> Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, et al.  $\beta$ -catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 1999;155(6):1795-801.
- <sup>163</sup> Mao TL, Chu JS, Jeng MY, Lai PL, Hsu HC. Expression of mutant nuclear  $\beta$ -catenin correlates with non invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread and good prognosis. *J Pathol* 2001;193(1):95-101.
- <sup>164</sup> Wong CM, Fan ST, Ng IO. Beta-catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathological and prognostic significance. *Cancer* 2001;92(1):136-45.
- <sup>165</sup> Inagawa S, Itabashi M, Adachi S, Kawamoto T, et al. Expression and prognostic roles of beta-catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):450-6.
- <sup>166</sup> Ueta T, Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N, Terada T. Beta-catenin and cyclin D1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9(6):1197-203.
- <sup>167</sup> Zulehner G, Mikula M, Schneller D, van Zijl F, et al. Nuclear  $\beta$ -catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. *Am J Pathol* 2010;176(1):472-81.
- <sup>168</sup> Pez F, Lopez A, Kim M, Wands JR, et al. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol* 2013;59(5):1107-17.
- <sup>169</sup> Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Alterations of beta-catenin and Tcf-4 instead of GSK-3 $\beta$  contribute to activation of Wnt pathway in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J* 2003;116(12):1885-92.
- <sup>170</sup> Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 2002;21(31):4863-71.
- <sup>171</sup> Park JY, Park WS, Nam SW, Kim SY, et al. Mutations of beta-catenin and AXIN 1 genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver Int* 2005;25(1):70-6.

- 
- <sup>172</sup> Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(9):994-1000.
- <sup>173</sup> Calvisi DF, Factor VM, Loi R, Thorgeirsson SS. Activation of beta-catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res* 2001;61(5):2085-91.
- <sup>174</sup> Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009;69(18):7385-92.
- <sup>175</sup> Micsenyi, A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, et al. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 2004;126(4):1134-46.
- <sup>176</sup> Harada N, Miyoshi H, Murai N, Oshima H, et al. Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of beta-catenin. *Cancer Res* 2002;62(7):1971-7.
- <sup>177</sup> Stauffer JK, Scarzello AJ, Andersen JB, De Kluyver RL, et al. Coactivation of AKT and  $\beta$ -catenin in mice rapidly induces formation of lipogenic liver tumors. *Cancer Res* 2011;71(7):2718-27.
- <sup>178</sup> Rignall B, Braeuning A, Buchmann A, Schwarz M. Tumor formation in liver of conditional beta-catenin-deficient mice expose to a diethylnitrosamine/phenobarbital tumor promotion regimen. *Carcinogenesis* 2011;32(1):52-7.
- <sup>179</sup> Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008;68(11):4287-95.
- <sup>180</sup> Banaś A. Komórki macierzyste-perspektywy i zagrożenia. *Prz Med Uniw Rzesz Inst Lekow* 2010;2:117-127.
- <sup>181</sup> Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23(3):435-45.
- <sup>182</sup> Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol* 2000;192(3):373-8.
- <sup>183</sup> Wu PC, Fang JW, Lau VK, Lai CL, et al. Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications. *Am J Pathol* 1996;149(4):1167-75.
- <sup>184</sup> Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* 2000;33(1):76-84.
- <sup>185</sup> Hu M, Kurobe M, Jeong YJ, Fuerer C, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;133(5):1579-91.
- <sup>186</sup> Apte U, Thompson MD, Cui S, Liu B, et al. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 2008;47(1):288-95.
- <sup>187</sup> Zekri ARN, Bahnassy AA, EI-Din HMA, Morsy HM, et al. Serum levels of  $\beta$ -catenin as a potential marker for genotype 4/hepatitis C associated hepatocellular carcinoma. *Oncology Rep* 2011;26(4):825-31.
- <sup>188</sup> Park CY, Choi SH, Kang SM, Kang JI, et al. Nonstructural 5A protein activates  $\beta$ -catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis. *J Hepatol* 2009;51(5):853-64.

- 
- <sup>189</sup> Liu J, Ding X, Tang J, Cao Y, et al. Enhancement of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activity by HCV core protein promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells. *PLOS One* 2011;6(11):e27496.
- <sup>190</sup> Arora P, Kim EO, Jung JK, Jang KL. Hepatitis methyltransferase 1 and 3b. *Cancer Lett* 2008;261(2):244-52.
- <sup>191</sup> Ripoli M, Barbano R, Balsamo T, Piccoli C, et al. Hypermethylated levels of E-cadherin promoter in Huh-7 cells expressing the HCV core protein. *Virus Res* 2011;160(1-2):74-81.
- <sup>192</sup> Bose SK, Meyer K, Di Bisceglie AM, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus induces epithelial-mesenchymal transition in primary human hepatocytes. *J Virol* 2012;86(24):13621-8.
- <sup>193</sup> Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, et al. E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:567305.
- <sup>194</sup> Kwiatkowski P, Godlewski J, Śliwińska-Jewsiewicka A, Kmiec Z. Cząsteczki adhezyjne w procesie nowotworzenia i przerzutowania, *Pol Ann M* 2009;16(1):128-37.
- <sup>195</sup> Pötter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissue. *Endocr Rev* 1999;20(2):207-39.
- <sup>196</sup> Nollet F, Kools P, Van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 2000;299(3):551-72.
- <sup>197</sup> Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(8):622-34.
- <sup>198</sup> Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008;121(6):727-35.
- <sup>199</sup> Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for P120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 2003;163(3):525-34.
- <sup>200</sup> Nelson WJ. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Tran* 2008;36:149-55.
- <sup>201</sup> Phillips MJ, Poucell S, Patterson J, Valencia P. The liver. An atlas and text of ultrastructural pathology. Raven Press, New York. 1987:2-3
- <sup>202</sup> Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, et al. Hakai, a c-Cbl-like protein ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 2002;4(3):222-31.
- <sup>203</sup> Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, et al. Adam10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and  $\beta$ -catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(26):9182-87.
- <sup>204</sup> Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, et al. A presenilin-1/ $\gamma$ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 2002;21(8):1948-56.
- <sup>205</sup> Strathdee G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 2002;15(25):373-9.
- <sup>206</sup> Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, et al. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of  $\beta$ -catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003;163(4):847-57.
- <sup>207</sup> Masszi A, Fan L, Rosivall L, McCulloch CA, et al. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of the TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for  $\beta$ -catenin. *Am J Pathol* 2004;165(6):1955-67.
- <sup>208</sup> Tian YC, Fraser D, Attisano L, Phillips AO. TGF- $\beta$ 1-mediated alterations of renal proximal tubular epithelial cell phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(1):F130-42.

- 
- <sup>209</sup> Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 2009;40(10):1365-76.
- <sup>210</sup> Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 2008;88(2):112-23.
- <sup>211</sup> Cheng JH, She H, Han YP, Wang J, et al. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(1):G39-49.
- <sup>212</sup> Myung SJ, Yoon JH, Gwak GY, Kim W, et al. Wnt signaling enhances the activation and survival of human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2007;581(16):2954-8.
- <sup>213</sup> Wu Y, Zhou BP. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(7):643-50.
- <sup>214</sup> Lazăr D, Tăban S, Ardeleanu C, Dema A, et al. The immunohistochemical expression of E-cadherin in gastric cancer; correlations with clinicopathological factors and patients' survival. *Rom J Morphol Embryol* 2008;49(4):459-67.
- <sup>215</sup> Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003;163(3):1101-7.
- <sup>216</sup> Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(6):a003129.
- <sup>217</sup> Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(2):131-42.
- <sup>218</sup> Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999;147(3):631-44.
- <sup>219</sup> Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, et al. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer* 2004;111(5):711-9.
- <sup>220</sup> Hulit J, Suyama K, Chung S, Keren R, et al. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res* 2007;67(7):3106-16.
- <sup>221</sup> Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61(9):3819-25.
- <sup>222</sup> Soyama A, Eguchi S, Takatsuki M, Kawashita Y, et al. Significance of the serum level of soluble E-cadherin in patients with HCC. *Hepatogastroenterology* 2008;55(85):1390-3.
- <sup>223</sup> Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998;51(7):506-11.
- <sup>224</sup> Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Mason DY. New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol* 1986;39(6):590-3.
- <sup>225</sup> Helak-Łapaj C. Metody analizy komputerowej ekspresji reakcji immunohistochemicznej i histochemicznej oraz ocena struktur w badaniach mikroskopowych. Doktorat UM Poznań 2012.
- <sup>226</sup> Behari J. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in liver biology and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;4(6):745-56.
- <sup>227</sup> Monga SP. Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43(7):1021-9.
- <sup>228</sup> Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 2002;21(54):8293-301.

- 
- <sup>229</sup> Li S, Mao M. Next generation sequencing reveals genetic landscape of hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* 2013;340(2):247-53.
- <sup>230</sup> Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44(6):694-8.
- <sup>231</sup> Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, et al. Whole genome sequencing of liver cancer identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 2012;44(7):760-4.
- <sup>232</sup> Li YS, Liu M, Nakata Y, Tang HB. B-catenin accumulation in nuclei of hepatocellular carcinoma cells up-regulates glutathione-s-transferase M3 mRNA. *World J Gastroenterol* 2011;17(13):1772-8.
- <sup>233</sup> Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, et al. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 2000;157(3):763-70.
- <sup>234</sup> Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, et al. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomic* 2013;102(2):74-83.
- <sup>235</sup> Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Genda T, et al. Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(12):1301-9.
- <sup>236</sup> Kalinina O, Marchio A, Urbanskii AI, Tarkova AB, et al. Somatic changes in primary liver cancer in Russia: a pilot study. *Mutat Res* 2013;755(2):90-9.
- <sup>237</sup> Herath NI, Walsh MD, Kew MC, Young J, et al. Cadherin/catenin complex appears to be intact in hepatocellular carcinomas from Australia and South Africa. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19(6):676-82.
- <sup>238</sup> Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7(4):542-6.
- <sup>239</sup> Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z. Mutation and overexpression of beta-catenin gene may play an important role in primary hepatocellular carcinoma among Chinese people. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(9):577-81.
- <sup>240</sup> Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Chergui D, et al. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999;155(3):703-10.
- <sup>241</sup> Tien LT, Ito M, Nakao M, Niino D, et al. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11(16):2398-401.
- <sup>242</sup> Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression. *J Korean Med Sci* 2003;18(2):211-7.
- <sup>243</sup> De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, et al. Somatic mutations of beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(15):8847-51.
- <sup>244</sup> Ihara A, Koizumi H, Hashizume R, Uchikoshi T. Expression of epithelial cadherin and alpha-and beta-catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1996;(23):1441-7.

- 
- <sup>245</sup> Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis: analysis of intrahepatic differential gene expression. *Am J Pathol* 2002;160(2):641-54.
- <sup>246</sup> Zhai B, Yan HX, Liu SQ, Chen L, et al. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 2008;14(37):5665-73.
- <sup>247</sup> Chen L, Hu L, Li L, Liu Y, et al. Dysregulation of  $\beta$ -catenin by hepatitis B virus X protein in HBV-infected human hepatocellular carcinomas. *Front Med China* 2010;4(4):399-411.
- <sup>248</sup> Guo C, Liu QG, Yang W, Zhang ZL, Yao YM. Relation among p130Cas, E-cadherin and beta-catenin expression, clinicopathologic significance and prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7(5):490-6.
- <sup>249</sup> Sun Y, Chua MS, Yang D, Tsalenko A, et al. Antibody arrays identify potential diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. *Biomark Insights* 2008;3:1-18.
- <sup>250</sup> Grégoire D, Akkari L, Carenco C, Hibner U. Replay to: "Are Hedgehog and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways involved in hepatitis C virus-mediated EMT?": persistent activation of Hedgehog or Wnt/ $\beta$ -catenin pathways is not involved in EMT mediated by HCV NS5A protein. *J Hepatol* 2013;58(3):637-8.
- <sup>251</sup> Higgs MR, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus- induced activation of  $\beta$ -catenin promotes c-Myc expression and a cascade of pro-carcinogenetic events. *Oncogene* 2013;32(39):4683-93.
- <sup>252</sup> Liu J, Wang Z, Tang J, Shan X, et al. Hepatitis C virus core protein activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through multiple regulation of upstream molecules in the SMMC-7721 cell line. *Arch Virol* 2011;156(6):1013-23.
- <sup>253</sup> Prange W, Breuhahn K, Fischer F, Zilkens C, et al. Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. *J Pathol* 2003;201(2):250-9.
- <sup>254</sup> Wei Y, Van Nhieu JT, Prigent S, Srivatanakul P, et al. Altered expression of E-cadherin in hepatocellular carcinoma :correlations with genetic alterations, beta-catenin expression, and clinical features. *Hepatology* 2002;36(3):692-701.
- <sup>255</sup> Nuruki K, Toyoyama H, Ueno S, Hamanoue M, et al. E-cadherin but not N-cadherin expression is correlated with the intracellular distribution of catenins in human hepatocellular carcinomas. *Oncol rep* 1998;5(5):1109-14.
- <sup>256</sup> Liu TA, Jan YJ, Ko BS, Liang SM, et al. 14-3-3 $\epsilon$  overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *PLOS One* 2013;8(3):e57968.
- <sup>257</sup> Garcia S, Martini F, De Micco C, Andrac L, et al. Immunoexpression of E-cadherin and beta-catenin correlates to survival of patients with hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 1998;12(2):443-7.
- <sup>258</sup> Mima K, Hayashi H, Kuroki H, Nakagawa S, et al. Epithelial-mesenchymal transition expression profiles as a prognostic factor for disease-free survival in hepatocellular carcinoma: Clinical significance of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Oncol Lett* 2013;5(1):149-154.
- <sup>259</sup> Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* 2009;50(6):1142-54.
- <sup>260</sup> Quan H, Zhou F, Nie D, Chen Q, et al. Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* doi:10.1038/onc2013.225.



- 
- <sup>261</sup> Ghosh S, Ahrens WA, Phatak SU, Hwang S, et al. Association of filamin A and vimentin with hepatitis C virus proteins in infected human hepatocytes. *J Viral Hepat* 2011;18(10):e568-77.
- <sup>262</sup> Iqbal J, McRae S, Mai T, Banaudha K, et al. Role of hepatitis C induced osteopontin in epithelial to mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocytes. *PLOS ONE* 2014;9(1):e87464.
- <sup>263</sup> Doi Y, Tamura S, Nammo T, Fukui K, et al. Development of complementary expression patterns of E-and N-cadherin in the mouse liver. *Hepatol Res* 2007;37(3):230-7.
- <sup>264</sup> Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148(4):779-90.
- <sup>265</sup> Zhan DQ, Wei S, Liu C, Liang BY, et al. Reduced N-cadherin expression is associated with metastatic potential and poor surgical outcomes of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27(1):173-80.
- <sup>266</sup> Kim JB, Islam S, Kim YJ, Prudoff RS, et al. N-cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. *J Cell Biol* 2000;151(6):1193-206.
- <sup>267</sup> Riou P, Saffroy R, Chenailler C, Franc B, et al. Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *FASEB J* 2006;20(13):2291-301.
- <sup>268</sup> Gwak GY, Yoon JH, Yu SJ, Park SC, et al. Anti-apoptotic N-cadherin signaling and its prognostic implication in human hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep* 2006;15(5):1117-23.
- <sup>269</sup> Straub BK, Rickelt S, Zibelman R, Grund C, et al. E-N-cadherin heterodimers define novel adherens junctions connecting endoderm-derived cells. *JCB* 2011;195(5):873-87.
- <sup>270</sup> Cho SB, Lee KH, Lee JH, Park SY, et al. Expression of E-and N-cadherin and clinicopathology in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int* 2008;58(10):635-42.
- <sup>271</sup> Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 1996;134(4):971-83.
- <sup>272</sup> Sharifi S, Hayek J, Khettry U, Nasser I. Immunocytochemical staining of Kupffer and endothelial cells in fine needle aspiration cytology of hepatocellular carcinoma. *Acta Cytol* 2000;44(1):7-12.
- <sup>273</sup> Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *2004*;82(3):175-181.
- <sup>274</sup> Sun S, Poon RT, Lee NP, Yeung C, et al. Proteomics of hepatocellular carcinoma: serum vimentin as a surrogate marker for small tumors (<or=2cm). *J Proteome Res* 2010;9(4):1923-30.
- <sup>275</sup> Wong KF, Luk JM. Discovery of lamin B1 and vimentin as circulating biomarkers for early hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2012;909:295-310.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

## Uchwała nr 182/12

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską,

**Komisja, na posiedzeniu w dniu: 02 lutego 2012 r.**

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

**prof. dr hab. Aldona Kasprzak**

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii UM w Poznaniu**

**Główny badacz: lek. med. Karol Rogacki**

**Temat**

**badan: "Rola komórkowej ekspresji  $\beta$ - kateniny i E-kadheryny jako markerów progresji zmian w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C".**

**Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań**

KOMISJA BIOETYCZNA

przy  
UNIwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
61-701 Poznań, ul. Fredry 10  
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax (+48 61) 854 61 07

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

13.02.2012

UNIwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
WYDZIAŁ LEKARSKI II  
DZIEKANAT

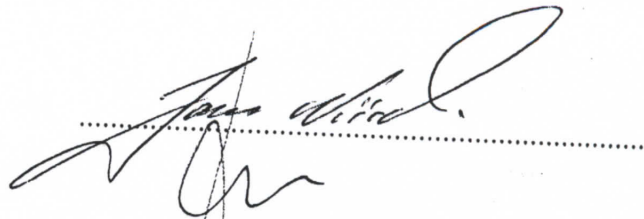
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70, II ptr., D-2  
tel. 061 8547 131; 132, fax 061 8547 133  
http://www.ump.edu.pl

Za zgodność z oryginałem

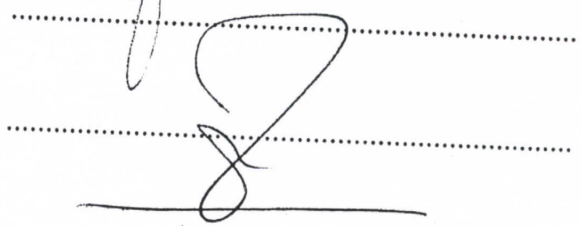
Poznań, dnia 23.04.2012r.

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 182/12 z dnia 02.02.2012r.

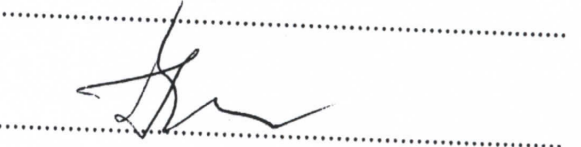
prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI



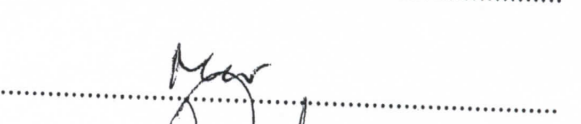
prof. dr hab. ROMAN SZULC



prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ



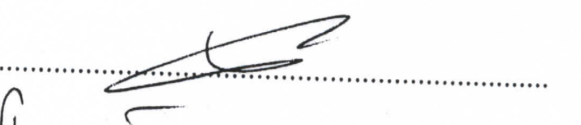
prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI



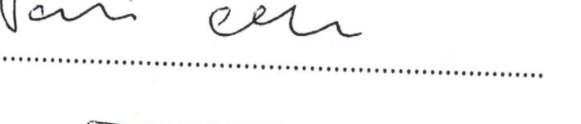
prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI



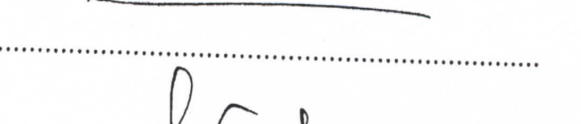
dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM



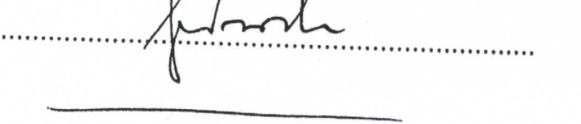
dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM



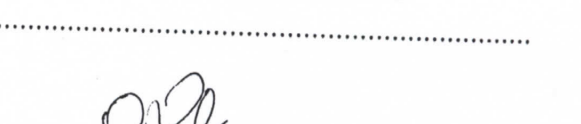
dr med. PIOTR TOMCZAK



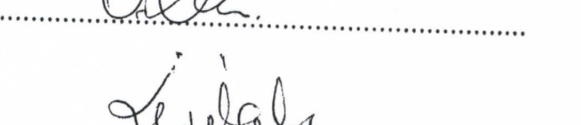
prof. dr hab. PAWEŁ CHĘCIŃSKI



prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK



ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA



dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI prof. UAM



dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA



BARBARA LIPIAK

KOMISJA BIOETYCZNA  
przy  
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
61-701 Poznań, ul. Fredry 10  
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60 z oryginałem  
fax (+48 61) 854 61 07

13.02.2012

UNIWERSYTET MEDYCZNY  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
WYDZIAŁ LEKARSKI II  
DZIEKANAT  
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70, II ptr., D-2  
tel. 061 8547 131; 132, fax 061 8547 133  
http://www.ump.edu.pl

Za zgodność z oryginałem  
Poznań, dnia 23.04.2012



## SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

02.02.2012r.

z dnia .....

Lp	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji <b>prof. dr hab. Zygmunt Przybylski</b>	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Świącickiego 6, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji <b>prof. dr hab. Janusz Wiśniewski</b>	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymaś	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Świącickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański prof. UAM	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Grunwald

**KOMISJA BIOETYCZNA**  
przy  
**UNIWEITYCIE MEDYCZNYM**  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
61-701 Poznań, ul. Fredry 10  
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax (+48 61) 854 61 07

**UNIWEITYCET MEDYCZNY**  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
**WYDZIAŁ LEKARSKI II**  
**DZIEKANAT**  
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70, II ptr., D-2  
tel. 061 8547 131; 132, fax 061 8547 133  
http://www.ump.edu.pl

13.02.2012 JES

za zgodność z oryginałem

Poznań, dnia 23.04.2012r.