

# Evaluacija serumskih biljega u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma kod ciroze jetre alkoholne etiologije

---

Unić, Adriana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:567242>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Adriana Unić

**EVALUACIJA SERUMSKIH BILJEGA U  
DIJAGNOZI HEPATOCELULARNOGA  
KARCINOMA KOD CIROZE JETRE  
ALKOHOLNE ETIOLOGIJE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Adriana Unić

**EVALUACIJA SERUMSKIH BILJEGA U  
DIJAGNOZI HEPATOCELULARNOGA  
KARCINOMA KOD CIROZE JETRE  
ALKOHOLNE ETIOLOGIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Ivica Grgurević

izv. prof. dr. sc. Marija Grdić Rajković

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Adriana Unić

**EVALUATION OF SERUM MARKERS IN  
DIAGNOSIS OF HEPATOCELLULAR  
CARCINOMA IN LIVER CIRRHOSIS OF  
ALCOHOL ETIOLOGY**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Associate Professor Ivica Grgurević, Ph.D.

Associate Professor Marija Grdić Rajković, Ph.D.

Zagreb, 2022.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj je doktorski rad izrađen pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Grgurevića i izv. prof. dr. sc. Marije Grdić Rajković, u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Izražavam veliku zahvalnost svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Ivici Grgureviću i izv. prof. dr. sc. Mariji Grdić Rajković na svim nesebičnim znanstvenim, stručnim i životnim savjetima, poticanju, podršci i pomoći, ali i na iskazanom povjerenju kroz sve faze stručnog i znanstvenog usavršavanja.

Veliko hvala cjelokupnom osoblju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava na podršci i pomoći tijekom cijelog procesa izrade doktorskog rada.

Hvala kolegicama i kolegama iz Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice, na motivaciji i podršci.

Hvala mojim prijateljima, posebno Domagoju i Lovorki, koji su bili tu od početka do kraja ovog putovanja.

Najveće i najiskrenije hvala mojoj obitelji.

Za Arju..

## SAŽETAK

Hepatocelularni karcinom (HCC) je epitelna zloćudna novotvorina s prisutnom hepatocelularnom diferencijacijom i najčešća je primarna zloćudna novotvorina jetre. Ciroza jetre je najznačajni rizični čimbenik za razvoj HCC-a. Stopa mortaliteta bolesnika s HCC-om je još uvijek gotovo jednaka stopi morbiditeta zbog kasnog postavljanja dijagnoze.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati dijagnostičku točnost alfa-fetoproteina (AFP) i lens culinaris aglutinin A-reaktivne frakcije alfa-fetoproteina (AFP-L3), des-gama-karboksi protrombina (PIVKAI), Glipikana 3 (GP3), Cistatina B (CSTB), antigena karcinoma skvamoznih stanica 1 (SCCA1) i hepatocitnog faktora rata (HGF) te modela GALAD, kao potencijalnih tumorskih biljega za HCC u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (ALC). Radiološke slikovne metode i/ili tkivno uzorkovanje (biopsija tumora) korišteni su kao "zlatni dijagnostički standard" u dijagnozi HCC-a. U istraživanje je bilo uključeno 83 ispitanika: 20 zdravih ispitanika, 31 bolesnik s ALC i 32 bolesnika s ALC i HCC-om. Venepunkcija periferne krvi provedena je za svakog ispitanika, a serumske koncentracije AFP-L3, PIVKAI, GP3, CSTB, SCCA1 i HGF određene su korištenjem komercijalnih ELISA kompleta.

Serumske koncentracije PIVKAI (AUC=0,903) i AFP (AUC=0,813) su bile značajno više u bolesnika s ALC i HCC-om u usporedbi s bolesnicima s ALC-om bez HCC-a, dok se individualna dijagnostička točnost ostalih ispitivanih biljega pokazala neadekvatnom u dijagnozi HCC-a kod bolesnika s ALC-om. Najviša dijagnostička točnost kod ispitivanja kombinacije tumorskih biljega u našoj studiji dobivena je kombiniranim određivanjem AFP-a i PIVKAI (AUC=0,974), sa značajno višom dijagnostičkom točnosti u odnosu na određivanje PIVKAI, biljega koji je pojedinačno pokazao najbolju dijagnostičku točnost za dijagnozu HCC-a kod ALC-a ( $p=0,031$ ). Koncentracija AFP-a pokazala je i diskriminativnu sposobnost za razlikovanje kurabilnog od inkurabilnog stadija bolesti (s obzirom na veličinu i broj tumora), što je potrebno potvrditi daljnjim istraživanjima. Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da AFP i PIVKAI imaju najbolju diskriminativnu sposobnost za dijagnozu HCC-a u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre, uz dodatno poboljšanje dijagnostičke točnosti ukoliko se koriste u kombinaciji. U usporedbi s ranijim istraživanjima, može se pretpostaviti da bi dijagnostička izvedba tumorskih biljega mogla ovisiti o etiologiji bolesti jetre u podlozi HCC-a, za što su potrebna daljnja istraživanja.

**Ključne riječi:** hepatocelularni karcinom, alkohol, ciroza jetre, PIVKAI, cistatin B



## SUMMARY

**Background:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer-related deaths worldwide, and accounts for 90% of all primary liver malignancies. Between 90 and 95% of HCC cases are diagnosed in patients with pre-existing cirrhotic livers. Among risk factors for both, cirrhosis and HCC, the most prevalent are hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) infections, alcoholism, fatty liver and hereditary metabolic diseases such as hemochromatosis or  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency. Since the treatment of HCC is the most effective when administered in the early stage of HCC, there is an obvious need for accurate diagnostic tool(s) for patients at risk. Up to now, HCC screening, regardless of etiology, has been based on alpha-fetoprotein (AFP) and liver ultrasound both of which have a limited diagnostic performance. Besides AFP, some of the potential serum tumor markers for HCC detection include: lens culinaris agglutinin (LCA) reactive fraction of AFP (AFP-L3), protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKAI), Glypican-3 (GP3), squamous cell carcinoma antigen 1 (SCCA1), while data on the performance of Cystatin B (CSTB) and hepatocyte growth factor (HGF) are still unclear. The GALAD model which combines AFP, %AFP-L3, and PIVKAI with gender and age of patients to assess the likelihood of the presence of HCC in patients with chronic liver disease, was also recently proposed as diagnostic tool for HCC.

AFP is the first serological test for HCC diagnosing and surveillance regardless of disease etiology. AFP is a major serum glycoprotein synthesized during fetal life, mainly by the yolk sac and the fetal liver.

AFP-L3 is the LCA-bound fraction of AFP. Previous research projects reported that malignant liver cells produce AFP-L3 even in early stages of HCC and it is determined as a highly specific marker for HCC.

PIVKAI is the second most commonly investigated marker for HCC besides AFP. This potential marker for HCC is abnormal prothrombin released into the circulation in cases where vitamin K-dependent carboxylase is inhibited in the liver or due to the absence of vitamin K or the presence of vitamin K antagonists. It has been shown that increased concentrations of PIVKA II may be independent of AFP increase in HCC patients.

GP3 is an oncofetal protein and is one of the members of heparan sulphate proteoglycans anchored to the plasma membrane. Since GP3 has been exclusively detected in HCC cells and

not in benign liver tissues, it has been investigated as another potential tumor marker for HCC detection.

SCCA is a member of serine protease inhibitor family, and recent studies have shown that SCCA consists of two homologous proteins SCCA1 and SCCA2. Although SCCA1 is found to be elevated in patients with HCC, its usefulness in diagnosing HCC is still doubtful. The mechanisms that could lead to dysregulation of SCCA1 during hepatocarcinogenesis are still largely unknown. Initial studies suggest that its expression may be enhanced by inflammatory cytokines, primarily TNF- $\alpha$ , as an anti-apoptotic response to cell death. The new mechanism involves the selective binding of hypoxia-induced factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) to the promoter, induced by hypoxia and oxidative stress conditions, such as iron overload.

Cystatins are endogenous inhibitors of lysosomal cysteine proteinases (cathepsin L, H, and S). Overexpression of CSTB, a member of the cystatin superfamily, has been reported in patients with HCC. Since ethanol alters the proteolytic activity of hepatic lysosomes, CSTB could also be a potential tumor marker of HCC of alcoholic etiology.

HGF is produced by stromal cells and stimulates proliferation of epithelial cells, motility, morphogenesis and angiogenesis in various organs. Specific binding of HGF to the c-Met receptor induces a change in c-Met protein, activates tyrosine protein kinase in the intracellular domain of the receptor, leading to phosphorylation of proteins such as phospholipase, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3k), Gab1-Grb2 and other molecules. It also activates downstream signaling pathways, which amplify the signal and transmit it to the nucleus, regulating proliferation, differentiation, contraction, movement, secretion, and cell division. The diagnostic performance of the mentioned HCC tumor markers has been mostly investigated in patients with cirrhosis of viral etiology.

Considering the possible differences in pathogenic pathways leading to cirrhosis and HCC development, the choice of marker(s) for diagnostic purpose might differ in relation to the etiology of liver disease. Since alcohol has become an important cause of liver cirrhosis an increasing number of HCC patients of this etiological background should be expected.

**Aim:** The main aim of this study was to investigate individual diagnostic performance of AFP, AFP-L3, PIVKAI<sub>II</sub>, GP3, CSTB, SCCA1 and HGF as well as combined diagnostic performance of potential tumor markers for HCC, including GALAD score, in patients with alcoholic liver cirrhosis (ALC) using imaging techniques and/or tumor biopsy as reference standards.

**Patients and methods:** Eighty-three participants were included: 20 healthy volunteers, 31 patients with ALC and 32 patients with ALC and HCC. The first sampling of peripheral venous blood was performed for each participant in the fasted state. Four types of tubes were sampled for each subject: for hematology, coagulation, biochemical tests and for determination of ammonia. The second sampling of peripheral venous blood was conducted after performing of imaging tests and before any therapeutic interventions. Tumor biopsy was performed after sampling (if it was indicated). Two serum tubes were sampled for each subject (for determination of proteins, metabolites, enzymes, and iron metabolism markers, hepatitis markers, autoimmune liver disease markers, carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) and AFP). The remaining serum samples were aliquoted for determination of AFP-L3, PIVKAI, GP3, SCCA1, CSTB and HGF, and aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis was performed. Serum concentrations of AFP-L3, PIVKAI, GP3, CSTB, SCCA1 and HGF were determined using commercial ELISA kits.

**Results:** PIVKAI showed the highest individual diagnostic performance ( $\text{AUC}=0,903$ ), and  $\text{AUC}$  of AFP was 0,813, whereas individual diagnostic performance of potential tumor markers (GP3, SCCA1, CSTB and HGF) was inadequate.

The 'best' combination of tumor markers examined in our study includes combination of AFP and PIVKAI with  $\text{AUC}$  of 0,974. Furthermore this combination has shown significantly better diagnostic accuracy when compared to PIVKAI alone ( $p=0,031$ ).

Also, the concentration of AFP showed a discriminant ability to distinguish curable from incurable stage of the disease (given the size and number of tumors), which needs to be confirmed by further research.

Concentrations of CSTB and SCCA1 are moderately related to model for end-stage liver disease (MELD), and may serve as a potential additional markers for the assessment of the functional stage of liver disease.

Among other performed tests, hemoglobin concentration, platelet count, alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities, ammonia and ferritin concentrations were significantly higher in patients with HCC and ALC than in patients with ALC.

**Conclusion:** The results of this study suggest that AFP and PIVKAI have the best discriminant ability to diagnose HCC in patients with ALC, with a further improvement in diagnostic accuracy when used in combination. Compared to the previous studies, it can be assumed that the diagnostic performance of tumor markers could be related to the etiology of HCC-based liver disease and further research is needed to confirm this claim.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma, alcohol, liver cirrhosis, PIVKAI, cystatin B

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hepatocelularni karcinom.....	2
1.1.1. Patofiziologija hepatocelularnoga karcinoma .....	3
1.1.2. Etiologija hepatocelularnoga karcinoma .....	5
1.2. Hepatocelularni karcinom kod bolesti jetre uzrokovane alkoholom .....	7
1.2.1. Alkohol kao faktor rizika za razvoj hepatocelularnoga karcinoma.....	7
1.2.2. Patogenetski i genetski mehanizmi alkoholom inducirane hepatokancerogeneze	8
1.3. Dijagnoza hepatocelularnoga karcinoma.....	9
1.3.1. Metode probira hepatocelularnoga karcinoma .....	10
1.3.2. Metode za dijagnozu hepatocelularnoga karcinoma .....	17
1.4. Klasifikacije stadija ciroze i hepatocelularnoga karcinoma .....	19
1.4.1. Klasifikacija stadija ciroze .....	19
1.4.2. Klasifikacija stadija hepatocelularnoga karcinoma.....	21
1.5. Liječenje hepatocelularnoga karcinoma .....	25
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>27</b>
2.1. Ciljevi i hipoteza istraživanja .....	28
2.1.1. Opći cilj istraživanja.....	28
2.1.2. Specifični ciljevi istraživanja .....	28
2.1.3. Hipoteza .....	28
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>29</b>
3.1. Ispitanici .....	30
3.2. Uzorci .....	32
3.3. Metode .....	33
3.3.1. Određivanje hematoloških parametara .....	34
3.3.2. Određivanje koagulacijskih parametara .....	34
3.3.3. Određivanje metabolita i supstrata .....	34

3.3.4.	Određivanje metabolizma željeza .....	34
3.3.5.	Određivanje enzima.....	35
3.3.6.	Određivanje proteina .....	35
3.3.7.	Serološke pretrage .....	35
3.3.8.	Određivanje tumorskih biljega .....	36
3.3.9.	Klasifikacija stadija jetrene bolesti .....	39
3.3.10.	Statistička analiza rezultata .....	39
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Opis skupine ispitanika.....	42
4.2.	Stadiji jetrene bolesti kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre .....	43
4.3.	Stadij hepatocelularnoga karcinoma kod bolesnika .....	45
4.4.	Hematološki i koagulacijski parametri .....	46
4.5.	Biokemijski parametri .....	48
4.6.	Tumorski biljezi kod zdravih ispitanika .....	51
4.7.	Tumorski biljezi kod bolesnika s alkoholnom cirozom sa i bez HCC-a .....	52
4.8.	Dijagnostička točnost tumorskih biljega u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma .....	55
4.9.	Razlikovanje kliničkog stadija HCC-a prema BCLC klasifikaciji .....	56
4.10.	Dijagnostička točnost kombinacije potencijalnih tumorskih biljega u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma.....	58
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS LITERATURE.....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS KRATICA .....</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA .....</b>	<b>93</b>

# **1. UVOD**

Organizam čovjeka sastoji se od bilijuna živih stanica koje rastu, dijele se i „umiru“ na visoko reguliran način kojim upravlja DNA. Kod fetusa i djece stanice se dijele brzo kako bi omogućile rast, dok se kod odraslih normalno dijele samo kako bi nadomjestile „istrošene“ i „umiruće“ stanice ili popravile ozljede.

U trenutku kada dođe do poremećaja u regulaciji staničnog ciklusa dolazi do razvoj bolesti. Temeljna abnormalnost koja rezultira razvojem raka je kontinuirana ne-regulirana proliferacija stanica. Umjesto da odgovarajuće reagiraju na signale koji kontroliraju normalno ponašanje stanica, stanice raka nekontrolirano rastu i dijele se te „napadaju“ zdrave stanice, tkiva, organe, što na kraju rezultira njihovim širenjem po tijelu. Generalizirani gubitak kontrole rasta, koji pokazuju stanice raka, rezultat je nagomilanih abnormalnosti u više regulatornih sustava stanica i ogleda se u nekoliko aspekata staničnog ponašanja koji razlikuju stanice raka od normalnih stanica (1).

Rak može nastati kao rezultat abnormalne proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu pa ih postoji više od stotinu različitih vrsta koje se mogu značajno razlikovati u svom ponašanju i odgovoru na liječenje (1).

Rak se klasificira prema vrsti stanice iz koje potječe. Većina zloćudnih tumora spada u jednu od tri glavne skupine: karcinomi, sarkomi i leukemije/limfomi. Karcinomi, koji uključuju otprilike 90% zloćudnih tumora, potječu iz epitelnih stanica (1).

### 1.1. Hepatocelularni karcinom

Hepatocelularni karcinom (HCC) je epitelna zloćudna novotvorina s prisutnom hepatocelularnom diferencijacijom i najčešća je primarna zloćudna novotvorina jetre (2, 3). Incidencija HCC-a veća je u višoj prosječnoj dobi, između 55 i 59 godina u Kini i 63 do 65 godina u Sjevernoj Americi i Europi. Više stope HCC-a zabilježene su u istočnoj i jugoistočnoj Aziji, istočnoj i zapadnoj Africi. Najnoviji podaci GLOBOCAN-a (engl. *The Global Cancer Observatory*) prikazuju oko 905 677 novih slučajeva i 830 180 smrtnih slučajeva od primarnog raka jetre u 2020. godini (4). Stoga, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) HCC smatra drugim vodećim uzrokom smrti od raka (5).

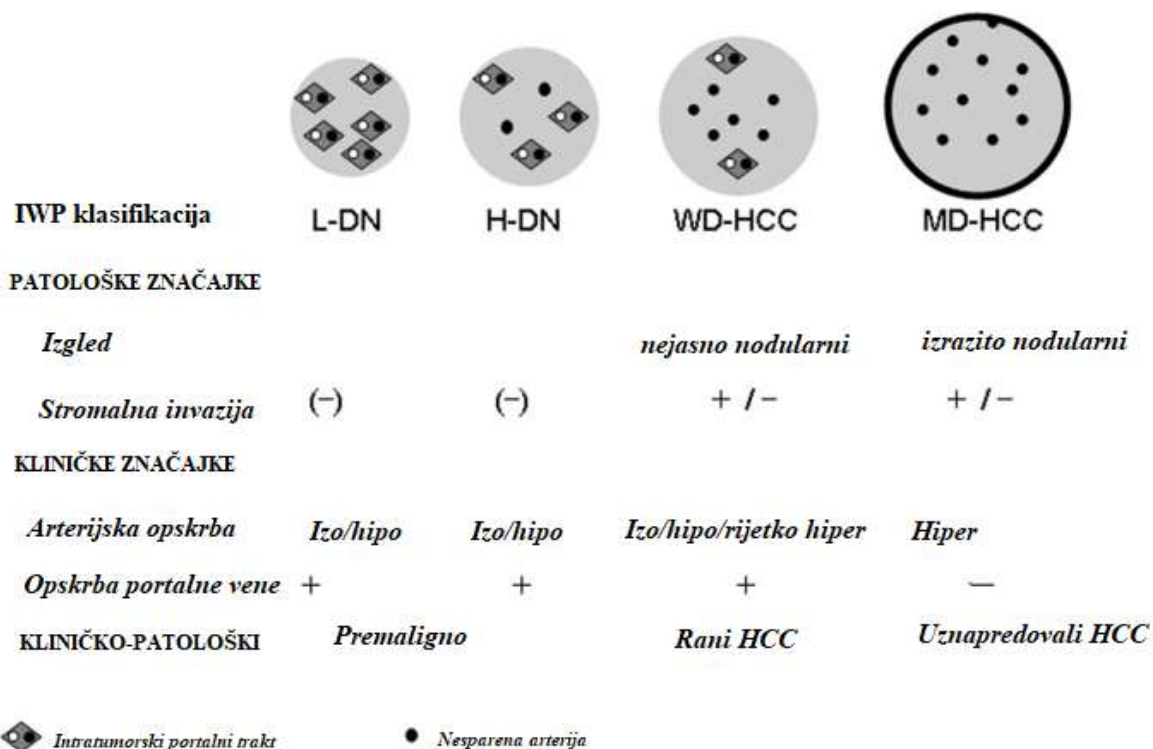
Prema procjenama, u Hrvatskoj 2020. godine, primarni karcinomi jetre učestaliji su u muškaraca i na 8. su mjestu prema učestalosti (395 slučajeva). Broj novootkrivenih karcinoma jetre gotovo je jednak stopi mortaliteta (12 slučajeva na 100 000 stanovnika) (6). Prema



podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo svega 6,2% ukupno dijagnosticiranih primarnih karcinoma jetre u 2018. godini je otkriveno u fazi lokaliziranog tumora (7).

### 1.1.1. Patofiziologija hepatocelularnoga karcinoma

Većina uzročnika HCC-a posreduje u ozljedi jetre razvojem upale i fibroze jetre, što u konačnici rezultira poremećenom arhitekturom, karakterističnom za cirozu jetre. Cirotična jetra pokazuju žarišna područja abnormalnih, nezrelih hepatocita, a ova displastična žarišta (<1 mm) ili displastični noduli ( $\geq 1$  mm) koji nastaju u pozadini ciroze smatraju se prekancerogenim lezijama (8). Međunarodna radna skupina (IWP, engl. *International Working Party*) svjetskoga kongresa za gastroenterologiju predložila je 1995. godine konsenzusnu nomenklaturu i dijagnostičke kriterije za hepatocelularne nodularne lezije. IWP je klasificirao nodularne lezije pronađene u kroničnoj bolesti jetre u velike regenerativne čvorove, displastične nodule niskog stupnja, displastične nodule visokog stupnja i HCC. IWP je uveo i koncept displastičnog žarišta kao nakupine hepatocita sa značajkama rane neoplazije (osobito promjene malih stanica ili žarišta bez željeza u siderotičnoj pozadini) manjih od 0,1 cm, a mali HCC definirao je kao tumor manji od 2 cm (9). Razlikovanje displastičnog nodula visokog stupnja od ranog HCC-a predstavlja sivu zonu u kliničkom smislu, a međunarodne konsenzusne smjernice predlažu preporuke za njihovo razlikovanje (10). U procjeni ovih lezija, prisutnost stromalne invazije je koristan kriterij malignosti. Prepoznavanjem prisutnosti ili odsutnosti invazije tumorskih stanica može se utvrditi radi li se o displastičnom nodulu ili HCC-u (10). HCC je hipervaskularna lezija, a tipična je za male HCC izrazito nodularnog tipa i za većinu umjereno diferenciranih malih HCC-a. Displastični noduli i većina ranih HCC-a su hipovaskularne lezije. Zajedno, patološke i slikovne značajke definiraju tri faze u evoluciji neoplazije u cirotičnoj jetri, gdje displastični noduli predstavljaju premalignu fazu, dobro diferencirani HCC nejasno nodularnog tipa predstavlja rani karcinom, a mali HCC izrazito nodularnog tipa i umjereno diferencirani HCC predstavljaju uznapredovali karcinom. U ne-cirotičnoj jetri razvojni proces HCC-a u ljudi nije u potpunosti razjašnjen (8, 10).



Slika 1. Dijagram koji sažima kliničke i patološke značajke razvoja HCC-a. **L-DN** – *displastični nodul niskog stupnja*; **H-DN** – *displastični nodul visokog stupnja*; **WD-HCC** – *dobro diferencirani HCC*; **MD-HCC** – *umjereno diferencirani HCC*. Prilagođeno prema International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (10).

Tipični simptomi HCC-a su bol u desnom gornjem kvadrantu i gubitak tjelesne mase (11). Bolesnici koji se prezentiraju ovim simptomima često imaju tumor u uznapredovaloj fazi. Pri fizikalnom pregledu jetra je često povećana te može biti tvrda i nepravilna. Sljedeći uobičajeni scenarij prezentiranja HCC-a je iznenadna dekompenzacija jetre kod bolesnika s prethodno potvrđenom cirozom jetre. Progresivno zatajenje jetre nastaje jer se zdravo tkivo jetre zamjenjuje tumorskom masom. Invazija portalne vene, koja je uobičajena za HCC, može doprinijeti smanjenju sintetske funkcije jetre smanjenjem učinkovitog protoka krvi u jetru (11). Ruptura tumora je rijetka i katastrofalna komplikacija HCC-a i može se dogoditi ukoliko veliki vaskularni tumor na periferiji jetre preraste svoj izvor opskrbe krvi. Kliničkom slikom u tom slučaju dominiraju jaki bolovi u trbuhu, vaskularni kolaps i znakovi iritacije peritoneuma. Ova vrsta puknuća javlja se spontano ili kod manje traume abdomena. Rijetko se mogu pojaviti i drugi klinički znakovi poput hipoglikemije, hiperkalcemije, policitemije, a može se pojaviti i sindrom feminizacije. Sve češće se HCC dijagnosticira u asimptomatskoj fazi. Tada su i tumori obično manji i podložniji potencijalnim terapijskim postupcima poput resekcije, transplantacije i ablacije tumora. Ovaj trend je prisutan zbog sve veće svijesti o riziku HCC-a kod bolesnika s kroničnim virusnim hepatitisom i cirozom. Oni se češće podvrgavaju programima pretraživanja

koji uključuju ultrazvuk (UZV), kompjutoriziranu tomografiju (CT) ili određivanje serumske koncentracije alfa-feto proteina (AFP) (12).

### 1.1.2. Etiologija hepatocelularnoga karcinoma

Većina slučajeva HCC-a događa se u cirotičnoj jetri, a time i etiologija HCC-a odražava etiologiju kronične bolesti jetre i ciroze (3). Općenito, čimbenici rizika za HCC uključuju virusne infekcije, toksine u okolišu, komorbiditete, nasljedne pogreške metabolizma i autoimune poremećaje (13). Jedinствена geografska, spolna i dobna raspodjela HCC-a u najvećoj mjeri je rezultat specifičnih obrazaca ovih čimbenika rizika (12).

Ciroza je vrlo važan rizični čimbenik za nastanak HCC-a, a ona može biti uzrokovana kroničnim virusnim hepatitisom, alkoholom, nealkoholnom masnom bolesti jetre te nasljednim metaboličkim bolestima poput hemokromatoze ili nedostatka  $\alpha$ -1-antitripsina. Dosadašnja istraživanja pokazuju da će 1/3 bolesnika s cirozom razviti i HCC što čini 2-8% bolesnika s cirozom godišnje (14).

#### 1.1.2.1. Genetska predispozicija nastanka hepatocelularnoga karcinoma

U ljudi nije dokazana genetska sklonost cirozi i karcinomu jetre. Obiteljsko grupiranje HCC-a opisano je kod kineskih i aljaških starosjedilaca, a slučajevi raka jetre zabilježeni su u djece nekoliko obitelji do tri generacije, ali oni su redovito bili povezani s kroničnom infekcijom virusom hepatitisa B (HBV) (15, 16).

Ipak, vrlo rijetko HCC nastaje u uvjetima koji imaju genetsko, urođeno ili metaboličko podrijetlo. Pojavnost HCC-a je zabilježena kod kongenitalne fibroze jetre, ataksije telengiektazije, obiteljske polipoze crijeva, obiteljske kolestatske ciroze, fetalnog alkoholnog sindroma, kod osoba s obrnutim položajem unutarnjih organa (*situs inversus*) i neurofibromatoze (15).

Među urođenim pogreškama metabolizma, kronični oblik nasljedne tirozinemije nosi najveći rizik od maligne bolesti jetre (17). Također, kod jetrenih porfirija zabilježen je 61 puta viši rizik za razvoj HCC-a. Nasljedna hemokromatoza je povezana s višim rizikom za razvoj HCC-a i to većinom kao posljedica ciroze, osobito kod muškaraca s ovom bolešću (18). Wilsonova bolest, također češće pogađa muškarce i dovodi do razvoja ciroze nakupljanjem bakra u hepatocitima.

Zabilježeno je nekoliko slučajeva HCC-a kod ovog poremećaja, ali uvijek popraćenih cirozom (15).

Nedostatak alfa-1-antitripsina je povezan s razvojem hepatitisa i ciroze tijekom djetinstva te emfizemom pluća i ciroze u odraslih (19).

### 1.1.2.2.    Ciroza jetre

Ciroza jetre je najpotentniji rizični faktor u nastanku HCC-a (20).

Kronična ozljeda jetre uzrokuje upalu i fibrozu jetre. Bez obzira na uzrok, ona može dovesti do stvaranja vlaknastih pregrada i nodula, kolapsa jetrenih struktura, distorzije jetrenog parenhima i vaskularne arhitekture. Uznapredovala fibroza i ciroza rezultiraju smanjenom metaboličkom i sintetičkom funkcijom jetre, uzrokujući porast koncentracije bilirubina i smanjenu sintezu faktora zgrušavanja i trombopoetina, sekvestraciju trombocita u slezeni, povećani portalni tlak te razvoj ascitesa i varikoziteta jednjaka (21).

Kada se uspostavi, ciroza ostaje kompenzirana kroz period čija duljina ovisi o izlječivosti osnovne bolesti. U ovom stanju, trajanje oštećenja jetre rezultira povećanjem fibroze i portalne hipertenzije (22). Ukoliko se uzrok otkloni, ciroza se može stabilizirati, a napredovanje zaustaviti. Međutim, ukoliko se uzrok ne ukloni, bolest će napredovati u dekompenziranu cirozu. Dekompensacija i varikoziteti jednjaka se javljaju kod klinički značajne portalne hipertenzije ( $\geq 10$  mmHg) pa je stoga dekompenzacija češća kod bolesnika s varikozitetom jednjaka (23). U kompenziranoj cirozi, stupanj razvoja varikoziteta jednjaka i dekompenzacije je oko 7–8%, odnosno 5% godišnje (22, 24).

Ascites je obilježje dekompenzacije i povezan je s petogodišnjom smrtnošću od oko 50% (25).

Hepatička encefalopatija i/ili žutica obično se javljaju u uznapredovalo cirozi, rijetko kao prvi znak dekompenzacije i povezane su s petogodišnjim preživljenjem od oko 20% (22, 26).

Bubrežna funkcija je često oštećena u bolesnika s uznapredovalom cirozom, što je posljedica ili progresivnog hemodinamskog poremećaja ili akutnih događaja poput krvarenja, infekcija ili nefrotoksičnosti. Uobičajena klinička slika je akutna ozljeda bubrega (AKI, engl. *acute kidney injury*), uključujući hepatorenalni sindrom tipa 1 ili 2 (27).

Također, zbog translokacije bakterija, uzrokovane napredovanjem portalne hipertenzije i disfunkcije jetre, infekcije su česte u uznapredovaloj cirozi, posebno u bolesnika s ascitesom. Upalni odgovor je često ozbiljan i povezan je sa zatajenjem organa (28-30).

HCC se javlja u 2–8% bolesnika s cirozom godišnje (14, 31-34). Medijan preživljenja nakon otkrivanja HCC-a je devet mjeseci u neliječenih bolesnika i približno dvije godine u liječenih bolesnika (22).

HCC koji nastaje u cirotičnoj jetri odražava etiologiju nastanka ciroze. Prema meta-analitičkim studijama utvrđeno je da je incidencija HCC-a najviša kod bolesnika s cirozom jetre kojoj je uzrok virus hepatitisa C (HCV) (4,81% godišnje), zatim kod jetrene ciroze čiji je uzrok HBV (3,23%), slijedi ciroza jetre kao posljedica toksičnog djelovanja alkohola (2,06%), a nešto nižu incidenciju pokazuju ciroza nastala kod autoimunih i genetskih bolesti jetre i to kod primarne bilijarne ciroze (1,79%), nealkoholnog steatohepatitisa (1,35%), primarne hemokromatoze (1,20%) i autoimunog hepatitisa (0,53%) (20).

10% do 20% bolesnika s tri najčešća uzroka bolesti jetre (HCV, HBV i alkohol) razvit će cirozu u razdoblju od 10 do 20 godina. Čimbenici povezani s povećanim rizikom razvoja ciroze uključuju starosnu dob, komorbiditete (posebno virus humane imunodeficijencije (HIV) i HCV) te muški spol (osim kod alkoholne bolesti jetre, gdje je razvoj ciroze brži kod žena) (35).

### **1.2. Hepatocelularni karcinom kod bolesti jetre uzrokovane alkoholom**

#### **1.2.1. Alkohol kao faktor rizika za razvoj hepatocelularnoga karcinoma**

Alkohol je klasificiran u grupu 1 kancerogena od strane Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (engl. *Agency for research on cancer*), a njegova konzumacija je povezana s povećanim rizikom razvoja nekoliko zloćudnih bolesti (36). Jedna trećina svih HCC-a, na globalnoj razini, povezana je sa zloupotrebom alkohola s varijacijama između geografskih područja (37, 38). Rizik se povećava s povećanjem konzumacije, a prisutan je već i kod doza od 10 g dnevno (39). Alkohol je nezavisni rizični čimbenik razvoja HCC-a s relativnim rizikom od 2,07 kod kroničnih alkoholičara u odnosu na osobe koje ne konzumiraju alkohol. Relativni rizik povišen je i kod osoba koje povremeno konzumiraju alkohol. Također, alkohol u kombinaciji s drugim rizičnim čimbenicima povećava rizik razvoja HCC-a pa je kod bolesnika

s dijabetesom koji unose prekomjerne količine alkohola (> 80 g/dnevno) rizik 2,2-2,9, a kod bolesnika s infekcijom HCV 19,1-53,9 (40).

Prema podacima SZO oko 280 milijuna ljudi, odnosno 4,1% populacije starije od 15 godina, zadovoljava kriterije definicije poremećaja konzumacije alkohola (ovisnost o alkoholu i zloupotreba alkohola) (41). Prevalencija je gotovo jednaka kao i prevalencija HBV infekcije, a četiri puta je viša od HCV infekcije (42).

### 1.2.2. Patogenetski i genetski mehanizmi alkoholom inducirane hepatokancerogeneze

Kronična konzumacija alkohola mijenja arhitekturu i utječe na funkcionalni kapacitet jetre uzrokujući steatozu, steatohepatitis i cirozu (43). Brojni patofiziološki čimbenici su specifični za alkoholom posredovanu hepatokancerogenezu uključujući i:

- 1) Stvaranje acetaldehida i njegov direktan utjecaj na proteine i DNA - Etanol se oksidira u acetaldehid pomoću enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) u citoplazmi (44, 45). Acetaldehid potom odlazi u mitohondrije gdje se oksidira do acetata mitohondrijskom aldehid dehidrogenazom (ALDH). Acetaldehid je visoko reaktivan i direktan mutagen koji formira različite proteinske i DNA adukte koji onemogućuju popravak DNA, potiču lipidnu peroksidaciju i oštećenje mitohondrija.
- 2) Oksidaciju etanola u mikrosomima enzimom CYP2E1 - Tijekom metabolizma alkohola putem CYP2E1 stvaraju se reaktivni spojevi kisika (ROS) i dolazi do re-oksidacije NADH u mitohondriju (46).
- 3) Povećanu sintezu citokroma P450 (CYP2E1) i/ili željezom induciranih ROS s oštećenjem antioksidativne obrane i mehanizama popravaka DNA – ROS dovode do oštećenja staničnih makromolekula i sudjeluju u progresiji jetrene kancerogeneze kroz stvaranje lipidnih peroksida kao što je 4-hidroksi-nonenal (44, 47). Akumulacija ROS-a dovodi do strukturnih i funkcijskih promjena DNA, utječe na funkcije gena (replikacija, transkripcija) i na taj način sudjeluje u procesima tumorske inicijacije i promocije (48). Akumulacija ROS-a inducira sintezu različitih citokina, aktivaciju imunskih stanica i potiče angiogenezu i metastaziranje (49). ROS se akumuliraju, izazivajući uzastopnu akciju pro- i antioksidativnih enzima, dok je antioksidativna obrana oštećena konzumacijom etanola (49).
- 4) Promjene u imunološkom sustavu i indukciju kronične upale – Alkohol ulazi u interakciju s imunološkim sustavom i utječe na imunološku kontrolu tumora, što dovodi

do razvoja i progresije tumora (44). Konzumacija alkohola povećava permeabilnost crijeva i translokaciju lipopolisaharida iz bakterija (LPS) iz crijeva u jetru. U Kupfferovim stanicama LPS ulazi u interakciju s TLR 4 (engl. *Toll-like receptor 4*) što dovodi do stvaranja pro-upalnih citokina kao što su interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  – engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ), koji su uključeni u hepatokancerogenezu (36). Iako točan mehanizam, kojim pro-upalni citokini sudjeluju u hepatokancerogenezi, nije do kraja razjašnjen, njihovi signali reguliraju ekspresiju gena putem transduktora signala i aktivatora transkripcije (STAT3) i nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B, jedan od glavnih transkripcijskih regulatora u upalnom odgovoru, aktivira se tijekom alkoholne bolesti jetre i povećava produkciju različitih pro-upalnih medijatora, uključujući i TLR koji potiče akumulaciju ROS-a i aktivaciju STAT3 (50).

- 5) Interferencije u prijenosu metilne grupe i posljedične promjene u ekspresiji gena - Oksidativni metaboliti poput acetaldehida i ROS-a, generirani metabolizmom alkohola, mogu inducirati epigenetske promjene promjenama metabolizma folata, bitne komponente sinteze i metilacije DNA. Polimorfizmi metil-tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR), koji dovode do promjena u metabolizmu folata, povezani su s razvojem HCC-a kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre (36, 44).

Ovi patofiziološki mehanizmi mogu biti pod utjecajem genske heterogenosti bolesnika, što djelomično može objasniti razliku inter-individualne osjetljivosti za razvoj HCC-a u bolesnika s alkoholnom cirozom (41, 44).

Od kliničkih faktora rizika, za razvoj HCC-a, kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre, starosna dob je jedan od najznačajnijih (36). Pokazano je da rizik za razvoj ciroze postaje značajan s konzumacijom alkohola od 60-80 g/dnevno kroz 10 godina u muškaraca i 20 g/dnevno kroz 10 godina u žena (51).

### 1.3. Dijagnoza hepatocelularnoga karcinoma

Oko 60% HCC-a se dijagnosticira u srednjem ili uznapređovalom stadiju, a potencijalni terapijski postupci (transplantacija jetre, resekcija, lokalna ablativna terapija) mogu se primijeniti samo kod bolesnika s ranim stadijem HCC-a (52).

Tradicionalno, dijagnoza HCC-a se temelji na nalazima citologije ili histologije tkiva jetre. Međutim, napredak u razumijevanju HCC-specifičnih radioloških značajki tijekom fazne

vaskularne perfuzije kontrasta za vrijeme presječnog snimanja slikovnim tehnikama, omogućio je da dijagnoza HCC-a u bolesnika s cirozom, koji su u programima praćenja, može biti pouzdano postavljena i bez biopsije (53).

Nekoliko opazajnih istraživanja pokazalo je da su programi pretraživanja kod bolesnika s cirozom jetre učinkoviti u detekciji tumora u ranoj fazi i da mogu poboljšati preživljenje (54).

Trenutne smjernice preporučuju programe pretraživanja za odrasle bolesnike s cirozom i visoko rizične bolesnike bez ciroze prema PAGE-B protokolu, koji uključuju bodovanje temeljem broja trombocita ( $\geq 200,000/\text{uL} = 0$ ,  $100,000\text{--}199,999/\text{uL} = 1$ ,  $<100,000/\text{uL} = 2$ ), dobi ( $16\text{--}29 = 0$ ,  $30\text{--}39 = 2$ ,  $40\text{--}49 = 4$ ,  $50\text{--}59 = 6$ ,  $60\text{--}69 = 8$ ,  $\geq 70 = 10$ ), spola (muškarci = 6, žene = 0) i prisutnosti infekcije HBV (bolesnici s HBV bez ciroze sa srednjim (10-17 bodova) ili visokim rizikom od razvoja HCC-a ( $\geq 18$  bodova) i bolesnici s kroničnom HCV infekcijom i značajnom fibrozom), a programi koriste UZV, sa ili bez određivanja koncentracije AFP-a, u razmacima od šest mjeseci. Preporuke su uglavnom jednoglasne među glavnim međunarodnim društvima, uključujući Američko udruženje za proučavanje bolesti jetre (AASLD - engl. *American Association for the Study of Liver Disease*), Europsko udruženje za proučavanje jetre (EASL – engl. *European Association for the Study of the Liver*) i Azijsko-pacifičko udruženje za proučavanje jetre (APASL – engl. *Asian Pacific Association for the Study of the Liver*) (55-58).

S obzirom da se rizik od HCC-a smanjuje nakon apstinencije od alkohola za 6-7% godišnje i da je potrebno 23 godine da se rizik izjednači s rizikom osoba koje ne konzumiraju alkohol, smatra se da bi u programe pretraživanja trebalo uključiti i bivše alkoholičare, neovisno o prisutnosti kompenzirane ciroze (59).

### 1.3.1. Metode probira hepatocelularnoga karcinoma

Optimalni probirni testovi dizajnirani su za otkrivanje asimptomatske ili subkliničke bolesti i moraju zadovoljiti nekoliko kriterija, uključujući visoku osjetljivost, isplativost i dostupnost. Bolesti prikladne za probir uključuju one koje opterećuju odabrane populacije s dokazanom strategijom liječenja i ishodima koji se poboljšavaju ranim otkrivanjem (60). Kada se probirni testovi koriste u redovitim intervalima u rizičnim populacijama, to se smatra pretraživanjem (58).



### 1.3.1.1. Slikovne tehnike

#### **Ultrazvuk**

UZV je jeftina i neinvazivna metoda probira bez ikakvog rizika ili izloženosti zračenju za bolesnika. Ultrazvučna detekcija HCC-a u cirotičnoj jetri ograničena je s nekoliko čimbenika, uključujući jetrene značajke poput abnormalne teksture jetre, karakteristike bolesnika (kao što je pretilost) i tehnička ograničenja poput kvalitete UZV-a i iskustva liječnika (61). Meta analiza koja je proučavala karakteristike učinka pretraživanja UZV-om za otkrivanje ranog HCC-a utvrdila je osjetljivost od 94% za otkrivanje HCC lezija u bilo kojoj fazi i osjetljivost od 63% za HCC u ranoj fazi. Dodavanje određivanja koncentracije AFP-a uz UZV nije rezultiralo statistički značajnim povećanjem osjetljivosti. Provođenje pretraživanja svakih 6 mjeseci, u odnosu na pretraživanje jednom godišnje, povećava osjetljivost na 70% za otkrivanje HCC-a u ranoj fazi (62). Studija koja je strogo pratila bolesnike s Child-Pugh (CP) stadijima A i B ciroze utvrdila je da se kombiniranjem određivanja AFP-a s UZV-om osjetljivost povećava s 32% na 65% za otkrivanje HCC-a u ranoj fazi (63). Utvrđeno je i da je korisnost UZV-a smanjena kod pretilih bolesnika i onih s cirozom alkoholne etiologije i nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD). Smatra se da je ovaj nedostatak povezan s promijenjenom vizualizacijom UZV-a u prisutnosti potkožnog masnog tkiva uz steatozu jetre. Posljedično, navedeno upućuje na neadekvatnu osjetljivost UZV-a u programima pretraživanja (64, 65).

#### **Kompjutorizirana tomografija**

CT kao slikovna tehnika ima nedostatke zbog velikog rizika od izlaganja zračenju i AKI, što je potrebno uzeti u obzir kada se razmatra odabir slikovne metode (66). Rezultati provedenog randomiziranog istraživanja, u kojem se ispitala osjetljivost programa pretraživanja UZV-om svakih 6 mjeseci i CT-om jednom godišnje, pokazali su da pretraživanje UZV-om ima višu osjetljivost (71,4 %) u usporedbi s CT-om (66,7%). Također, troškovi pretraživanja UZV-om bili su niži (67).

#### **Magnetska rezonancija**

Magnetska rezonancija (MRI) najosjetljivija je slikovna tehnika za dijagnozu HCC-a, ali njena je upotreba ograničena visokim troškovima i niskom dostupnošću. Provedeno je istraživanje kojim se uspoređivala dijagnostička točnost za detekciju HCC-a, kod pretraživanja bolesnika s HBV infekcijom, MRI i UZV-om i utvrđeno je da MRI sa specifičnim kontrastom ima višu

osjetljivost i specifičnost. MRI je bio značajno osjetljiviji u otkrivanju HCC-a u vrlo ranoj fazi s osjetljivošću od 84,8% u usporedbi s UZV koji je pokazao osjetljivost od 27,3% (68).

### 1.3.1.2. Serumski biljezi

Tijekom posljednjih desetljeća postignuta su poboljšanja u terapijskom pristupu, ne samo za rani, već i za uznapredovali HCC. Unatoč terapijskom poboljšanju, nije bilo značajnog kliničkog pomaka u primjeni serumskih biljega za praćenje i ranu dijagnozu HCC-a.

Novi serumski biljezi ispituju se i imaju sve veću primjenu u probiru HCC-a kod bolesnika s cirozom, uključujući rano otkrivanje, prognozu i praćenje (69).

Idealan tumorski biljeg trebao bi imati mogućnost otkrivanja HCC-a kod asimptomatskih bolesnika, trebao bi biti lako dostupan za praćenje bolesnika, s relativno visokom dijagnostičkom osjetljivošću i specifičnošću, neinvazivan i jeftin, što bi omogućilo njegovu široku primjenu (70). Određivanje koncentracije serumskih biljega za HCC važno je u otkrivanju i praćenju HCC-a.

AFP, lens culinaris aglutinin A-reaktivna frakcija alfa-fetoproteina (AFP-L3) i des-gama-karboksi protrombin (PIVKAI) utvrđeni su kao HCC-specifični tumorski biljezi (71-74). Iako određivanje koncentracija tumorskih biljega nije uključeno u dijagnostičke kriterije za HCC ili u preporuke za njegovo pretraživanje u smjernicama AASLD i EASL (55, 56) oni pružaju vrijedne informacije u dijagnozi HCC-a.

Osim navedenih biljega, korisnima u ranoj dijagnozi pokazali su se i glipikan-3 (GP3) te GALAD statistički model koji je izveden iz podataka o spolu, dobi te koncentracijama AFP-a, AFP-L3 i PIVKAI.

### **Alfa-fetoprotein**

Prvi serološki test za otkrivanje i kliničko praćenje bolesnika s HCC-om bio je AFP koji je već dugi niz godina standardni tumorski biljeg za HCC, neovisno o etiologiji bolesti. AFP je glikoprotein kojeg sintetiziraju fetalna jetra i žumanjčana vrećica tijekom trudnoće. Gen za AFP je član superobitelji gena koja obuhvaća gene za serumski albumin, protein koji vezuje vitamin D i alfa albumin. Svi nabrojani proteini sintetiziraju se u jetri. AFP je kodiran genom na dužem kraku 4. kromosoma (4q11-q13) (75). Koncentracije AFP-a mogu biti povišene u ranim fazama

HCC-a, a zatim se sniziti ili čak normalizirati prije ponovnog porasta kada uslijedi progresija bolesti (76). Povišena koncentracija AFP-a može biti prisutna kod akutnog i kroničnog hepatitisa B kao i kod bolesnika s cirozom uzrokovanom hepatitisom C. U kohortnoj studiji koja je provedena na 239 bolesnika s kroničnim hepatitisom, 277 bolesnika s cirozom i 95 bolesnika s HCC-om u različitim stadijima bolesti, za dijagnozu HCC-a utvrđena je osjetljivost AFP-a od 78,9% i specifičnost od 78,1% pri graničnoj vrijednosti višoj od 20 ng/mL. Pri graničnoj vrijednosti od 200 ng/mL, specifičnost biljega se povećava na 99,6% na račun smanjenja osjetljivosti na 52,6% (77). Općenito, stalno povišena koncentracija AFP-a u serumu (viša od 500 ng/mL) ukazuje na prisutnost HCC-a. Niže serumske koncentracije, koje su samo prolazne prirode, češće su prisutne kod benigne bolesti jetre (78). Koncentracije AFP-a u serumu ne koreliraju dobro s prognostičkim značajkama HCC-a kao što su veličina tumora, stadij ili napredovanje bolesti, a također mogu biti prisutne etničke varijabilnosti (76). Ukupni AFP možemo podijeliti u tri različita glikoforme, AFP-L1, AFP-L2 i AFP-L3, na temelju njihove sposobnosti vezanja na aglutinin - lektin lens culinaris (LCA).

### **Lens culinaris aglutinin A-reaktivna frakcija alfa-fetoproteina**

AFP-L3, kao LCA vezana frakcija, glavna je glikoforma AFP-a u serumu bolesnika s HCC-om, a može se otkriti u približno 35% bolesnika s malim HCC-om (<3 cm), posebno kada se tumorska masa opskrbljuje jetrenom arterijom. Pri graničnoj vrijednosti od 15% (AFP-L3/AFP), osjetljivosti AFP-L3 u otkrivanju HCC-a kreću se od 75% do 96,9%, a specifičnosti od 90% do 92,0% (79). Klinička istraživanja pokazala su da je visoki udio AFP-L3 usko povezan s lošom diferencijacijom i malignim karakteristikama (posebno invazijom portalne vene) HCC-a (79, 80), a bolesnici s HCC-om s povišenim udjelom AFP-L3 imaju lošiju funkciju jetre, lošiju histologiju tumora i veću tumorsku masu (81).

### **Des-gama-karboksi protrombin (PIVKAI)**

PIVKAI je abnormalni protrombin koji se oslobađa u cirkulaciju u slučajevima kada je inhibirana o vitaminu K ovisna karboksilaza u jetri, zbog nedostatka vitamina K ili prisutnosti antagonista vitamina K. PIVKAI nije prisutan u cirkulaciji zdravih osoba, a umjereno povišene koncentracije prisutne su kod bolesnika s cirozom jetre i metastazirajućim karcinomom jetre (82, 83). Koncentracije PIVKAI više od 0,1 AU/ml (100 ng/mL) upućuju na HCC ili recidiv tumora. Normalizacija koncentracije PIVKAI dobro korelira s uspješnom resekcijom tumora i čini ga izvrsnim biljekom aktivnosti tumora. Korelacija između veličine tumora i koncentracije

PIVKAI2 još nije jasno definirana. Čini se da postoji korelacija između koncentracije PIVKAI2 i velikih tumora, međutim, isti slučaj nije kod malih tumora (<3 cm) (82). Presječna studija koja je uključivala 207 bolesnika utvrdila je da je PIVKAI2 specifičniji od AFP-a u razlikovanju HCC-a od ne-maligne bolesti jetre (ciroza i kronični hepatitis). Na temelju rezultata ove studije zaključeno je da granična koncentracija PIVKAI2 od 125 mAU/mL daje najbolju osjetljivost i specifičnost za razlikovanje bolesnika s HCC od onih s cirozom i kroničnim hepatitisom (84).

### Glipikan -3

Glipikan-3 (GP3), membranski usidreni heparan sulfat proteoglikan, u interakciji je s faktorima rasta i modulira njihove aktivnosti. Veže se na staničnu membranu kroz sidra glikozil-fosfatidilinozitola (85). GP3 mRNA ekspresija je značajno pojačana u tkivu HCC-a u usporedbi s ekspresijom u okolnom tkivu jetre, tkivu jetre zdravih odraslih osoba i tkivu jetre bolesnika s ne-maligim bolestima jetre. Ekspresija GP3 (i na razini mRNA i na razini proteina) u serumu bolesnika s HCC-om je značajno viša od one u serumu zdravih odraslih osoba ili bolesnika s ne-malignom bolešću. Može se otkriti u 40–53% bolesnika s HCC-om i 33% bolesnika s HCC-om koji nemaju povišene koncentracije AFP-a i PIVKAI2 (85, 86).

### GALAD statistički model

GALAD model kombinira AFP, AFP-L3 i PIVKAI2 sa spolom i dobi bolesnika za procjenu vjerojatnosti prisutnosti HCC-a u bolesnika s kroničnom bolešću jetre na temelju sljedeće jednačbe:  $Z = -10,08 + 1,67 \times [\text{spol} (1 \text{ za muškarce, } 0 \text{ za žene})] + 0,09 \times [\text{dob}] + 0,04 \times [\text{AFP-L3}\%] + 2,34 \times \log[\text{AFP}] + 1,33 \times \log[\text{PIVKAI2}]$ . Procjena vjerojatnosti prisutnosti HCC-a izračunava se na sljedeći način:  $\text{Pr}(\text{HCC}) = \exp(Z) / (1 + \exp[Z])$  (87).

Pokazano je da model GALAD ima veću dijagnostičku točnost za otkrivanje HCC-a u usporedbi s određivanjima koncentracije AFP, AFP-L3 i PIVKAI2 biljega pojedinačno ili u kombinaciji. Područje ispod ROC krivulje (AUC- engl. *area under the curve*) GALAD rezultata za otkrivanje HCC-a iznosilo je 0,95 (95% interval pouzdanosti (CI): 0,93–0,97), što je više od AUC UZV-a (0,82;  $P < 0,01$ ). Na graničnoj vrijednosti od -0,76, GALAD model imao je osjetljivost od 91% i specifičnost od 85% za otkrivanje HCC-a. AUC GALAD modela za otkrivanje ranog stadija HCC-a ostao je visok i iznosio je 0,92 (95% CI: 0,88–0,96, uz graničnu vrijednost -1,18 i osjetljivost 92% te specifičnost 79%). Kombinacija GALAD-a i UZV-a (GALADUS model) dodatno može poboljšati izvedbu GALAD modela uz AUC od 0,98 (95% CI: 0,96–0,99 uz graničnu vrijednost od -0,18 te osjetljivost 95% i specifičnost 91 %) (88).

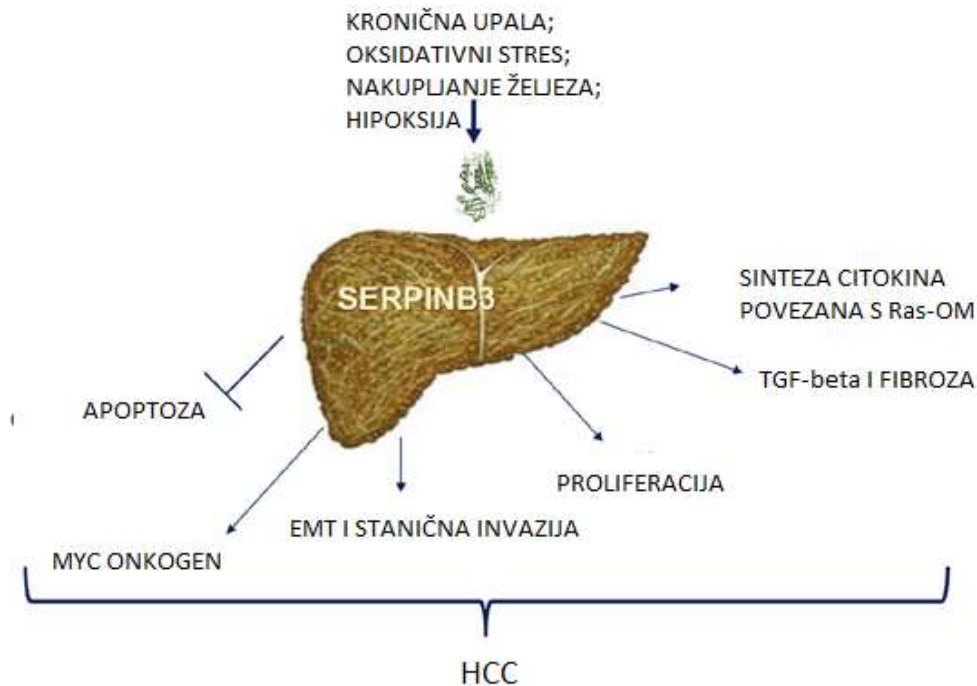
### 1.3.1.3. Serumski biljezi kod hepatocelularnoga karcinoma alkoholne etiologije

Iako je čitav niz biljega uključen u neku od faza ispitivanja za ranu dijagnozu HCC-a, ostaje problem heterogenosti etioloških faktora koji dovode do hepatokancerogeneze. Većina biljega koji se ispituju uključuju heterogenu skupinu bolesnika s obzirom na etiološke faktore, a najveći broj ih ipak uključuje HBV i HCV infekcije.

S obzirom da je alkohol prepoznat kao direktni kancerogen (36) i da se mehanizmi hepatokancerogeneze razlikuju, ispitivanje biljega u budućnosti trebalo bi ograničiti na izdvojene etiološke čimbenike.

#### **Antigen pločastih stanica karcinoma-1**

SerpinB3 (antigen pločastih stanica karcinoma-1 ili SCCA1) član je porodice inhibitora serinskih proteaza (SERPINS). SerpinB3 i njegova visoko homologna izoforma SerpinB4 (antigen pločastih stanica karcinoma-2 ili SCCA2) izvorno su pročišćeni iz karcinoma skvamoznih stanica vrata maternice (89). Kodirani su s dva odvojena gena smještena na kromosomu 18q21.3, koji dijele visok stupanj homologije (do 98%). Dva kodirana glikoproteina imaju molekularnu težinu od 45 kDa, a sastoje se od 390 aminokiselina s do 92% sličnog sastava (90). Posljednjih godina nekoliko istraživanja otkrilo je nova biološka svojstva SerpinB3 na polju karcinogeneze jetre. Mehanizmi koji bi mogli dovesti do poremećaja regulacije SerpinB3 tijekom hepatokarcinogeneze još uvijek su uglavnom nepoznati. Početna ispitivanja ukazuju da njegovu ekspresiju mogu pojačati upalni citokini, prvenstveno TNF- $\alpha$ , kao anti-apoptotski odgovor na staničnu smrt (91). Novi mehanizam uključuje selektivno vezanje hipoksijom induciranog čimbenika-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) na promotor SERPINB3 (92), potaknuto uvjetima hipoksije i oksidacijskog stresa, poput preopterećenja željezom (92-94).



Slika 2. Shematski prikaz čimbenika koji sudjeluju u indukciji SerpinaB3 i njegovih pro-onkogenih svojstava. Prilagođeno prema Cannito S. i suradnicima (92).

### Cistatin B (Stefin B)

Gen stefin B nalazi se na ljudskom kromosomu 21q22.3 i sadrži 3 eksona i 2 introna. Duljina transkripta mRNA stefina B je 294 pb. Smatra se da stefin B (CSTB) ima ulogu u zaštiti citoplazmatskih proteina i proteina citoskeleta od cisteinskih proteaza koje se slučajno oslobađaju iz lizosoma. Viša koncentracija CSTB u tumorima utvrđena je kod karcinoma pluća, dojke, glave i vrata te prostate, kao i kod mišjih limfosarkoma, hepatoma i Lewisova karcinoma pluća. Te više koncentracije, do određene točke, mogu uravnotežiti prekomjernu aktivnost cisteinskih katepsina, povezanu s preuređivanjem matriksa (što rezultira napredovanjem bolesti). S druge strane, visoke koncentracije CSTB u citoplazmi mogu biti relevantne za regulaciju apoptoze, inhibirajući katepsin B, koji je predložen kao dominantna proteaza u lizosomskim apoptotičkim putovima, induciranim putem  $TNF-\alpha$  u raznim stanicama tumora (95).

Rezultati jedne studije pokazuju da su stefini uključeni u progresiju i sklonost metastaziranju HCC-a (96). Također, ispitivanja sugeriraju da se koncentracija CSTB u serumu modulira postojanjem ciroze jetre i razvojem HCC-a (97). S obzirom da etanol mijenja proteolitičku aktivnost jetrenih lizosoma (98) CSTB bi također mogao biti potencijalni tumorski biljeg HCC-a alkoholne etiologije.

### **Hepatocitni faktor rasta**

Hepatocitni faktor rasta (HGF) proizvode različite vrste stanica. Široko je rasprostranjen u tkivima i može sudjelovati u održavanju i regeneraciji vitalnih organa kao što su jetra, pluća i bubrezi. Specifično vezanje HGF-a na receptor c-Met inducira promjenu c-Met proteina, aktivira tirozin protein kinazu (TPK) u unutarstaničnoj domeni receptora, što dovodi do fosforilacije proteina, poput fosfolipaze (PLC $\gamma$ ), fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3k), Gab1- Grb2 i drugih molekula. Također, aktivira nizvodne signalne putove (poput Ras/MAPK, PI3K/Akt i STAT, itd.), koji pojačavaju signal i konačno ga prenose u jezgru, regulirajući proliferaciju, diferencijaciju, kontrakciju, kretanje, sekreciju i diobu stanica (99).

Kod bolesti jetre dolazi do redukcije hepatocita i pojačane potrebe za proliferacijom hepatocita, što dovodi do pojačane regulacije c-Met i/ili HGF. Iako je ovaj mehanizam potencijalno koristan kod bolesti jetre, pojačana c-Met aktivnost može inicirati progresiju HCC-a (99). Koncentracije HGF-a, IL-1 $\alpha$  i IL-6 povećavaju se s ozbiljnošću alkoholne ciroze jetre, a koncentracija HGF-a povećava se s porastom koncentracije proupalnih citokina (100). Stopa detekcije HGF-a i koncentracija u serumu značajno su viši u bolesnika s malim brojem trombocita nego u bolesnika s visokim brojem trombocita što ukazuje da je HGF viši u bolesnika s višim stupnjem fibroze jetre (101).

### **1.3.2. Metode za dijagnozu hepatocelularnoga karcinoma**

Prema važećim smjernicama, dijagnoza HCC-a u bolesnika s cirozom postavlja se temeljem nalaza neinvazivnih pretraga (radiološke slikovne metode) i/ili tkivnim uzorkovanjem (biopsijom tumora) (56).

#### **1.3.2.1. Slikovne metode u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma**

Neinvazivni kriteriji za dijagnozu mogu se primijeniti samo kod bolesnika s cirozom jetre za nodul(-e)  $\geq 1$  cm i temelje se na radiološkim slikovnim metodama (višeslojna kompjutorizirana tomografija (MSCT), MRI i UZV) s upotrebom kontrasta. Dijagnoza se u ovom slučaju temelji na identifikaciji tipičnih obilježja HCC-a. Slikovne metode uz intravensku aplikaciju kontrasta temelje se na snimanju po višefaznom protokolu (promatranje kontrasta u kasnoj arterijskoj fazi, u fazi portalne vene i kasnoj fazi). Tipično obilježje HCC-a je kombinacija hipervaskularnosti u kasnoj arterijskoj fazi (definiranoj kao arterijska faza hiperpojačanja

prema LI-RADS (engl. *liver imaging reporting and data system*) klasifikaciji i postojanje fenomena ispiranja (engl. „*wash-out*“) kontrasta iz promatrane lezije u portovenskoj ili kasnoj fazi, što odražava vaskularni poremećaj koji se javlja tijekom hepatokancerogeneze (56).

### 1.3.2.2. Metode tkivne dijagnostike u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma

U bolesnika bez ciroze te u bolesnika s cirozom s nejasnim nalazom slikovnih metoda ili nodulom/nodulima < 1 cm, dijagnozu HCC-a potrebno je postaviti patohistološki iz materijala dobivenog minimalno invazivnim metodama: 1) tankoiglenom aspiracijom (FNA – engl. *fine needle aspiration*) kojom se dobiva materijal za citološku analizu ili 2) biopsijom debelom iglom (engl. *core biopsy*) kojom se dobiva cilindar tkiva očuvane arhitekture temeljem kojeg se postavlja dijagnoza (56).

Biopsija se može provoditi perkutano ili tranjungularno, a aspiracija se izvodi perkutano, endoskopski ili laparoskopski (56).

S obzirom da su histopatološki kriteriji maligniteta u hepatocelularnim tumorima značajna citološka i histološka atipija te intersticijalna i vaskularna invazija, ranu dijagnozu HCC-a i dobro diferencirani HCC potrebno je nadopuniti imunohistološkom analizom biljega povezanih s malignom transformacijom hepatocita (10, 56).

Kombinacija tri različita biljega (HSP70 (HSPA7), GP3 i glutamin sintetaze (GS)) pokazala se kao dodatna potpora dijagnozi visoko diferenciranog HCC-a kod kirurški dobivenih uzoraka tkiva, a njihova specifičnost je dodatno potvrđena i u uzorcima dobivenim perkutanom biopsijom. Dodatno se mogu provoditi i određena imunokemijska bojenja u cilju subklasifikacije tumora te u budućnosti i dodatne molekularne klasifikacije ovisno o zahtjevima novih terapijskih opcija (56).



## 1.4. Klasifikacije stadija ciroze i hepatocelularnoga karcinoma

Većina klasifikacijskih sustava za procjenu stadija ciroze i HCC-a razvijena je u svrhu prognoze bolesnika s cirozom i/ili HCC-om, a nekoliko sustava predloženo je i u svrhu odabira optimalnog terapijskog pristupa (102).

### 1.4.1. Klasifikacija stadija ciroze

#### 1.4.1.1. Child-Pugh klasifikacija

Child-Pugh (CP) klasifikacija je najjednostavniji i najčešće korišten sustav ocjenjivanja funkcije jetre. S obzirom na to da većina HCC-a nastaje u miljeu ciroze, a kirurške intervencije imaju najveći potencijal izlječenja, CP je sveprisutan u procjeni HCC-a.

Iako se najčešće koristi u procjeni funkcije jetre kod ciroze/HCC-a, ovaj bodovni sustav ima mnogo nedostataka, uključujući međulaboratorijske varijacije, dnevne varijabilnosti uključenih parametara i subjektivnu prirodu kliničke ocjene encefalopatije i ascitesa (103). Bodovanje u CP prikazano je u Tablici 1 (104).

Tablica 1. Child-Pugh klasifikacija ciroze

	<i>Bodovi</i>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<i>Encefalopatija</i>	Nije prisutna	Stupanj I i II	Stupanj III i IV
<i>Acites</i>	Nije prisutan	Malo	Umjeren
<i>Bilirubin (umol/L)</i>	34,2	34,2-51,3	> 51,3
<i>Albumin (g/L)</i>	> 35	28-35	< 28
<i>INR</i>	< 1,7	1,7 – 2,2	> 2,2
<b><i>Ukupno bodovi</i></b>	<b>5-6</b>	<b>7-9</b>	<b>10-15</b>
<b><i>CP</i></b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>

\*CP- Child – Pugh stadij; INR - internacionalni normirajući omjer protrombinskog vremena zgrušavanja

## 1.4.1.2. Model za završni stadij bolesti jetre

Model za završni stadij bolesti jetre odnosno MELD (engl. *model for end-stage liver disease*) klasifikacija, koji je razvijen za procjenu prognoze bolesnika nakon transjugularnog intrahepatičnog portosistemskog šanta (TIPS, engl. *transjugular intrahepatic portosystemic shunt*) kod zatajenja jetre (105), danas se koristi kako bi se odredili prioritetni bolesnici za transplantaciju jetre, a može se primijeniti na sve bolesnike sa završnim stadijem bolesti jetre kao standard za procjenu 3-6 mjesječnog preživljenja bolesnika (103). Što je veći dobiveni zbroj, prognoza bolesti je lošija. Pridružen broj bodova predviđa stopu mortaliteta i stratificira bolesnika na transplantacijskoj listi (Tablica 2). U praksi se MELD rezultat od 15 smatra granicom iznad koje treba razmotriti transplantaciju jetre (osim kada je prisutan HCC) (106). Za njegovo se računanje koriste laboratorijski parametri: ukupni bilirubin, INR i kreatinin, a računa se prema formuli:  $MELD = 3,78 \times \ln(\text{bilirubin } \mu\text{mol/L}) + 11,2 \times \ln(\text{INR}) + 9,57 \times \ln(\text{kreatinin mg/dL}) + 6,4$  (103).

Tablica 2. MELD klasifikacija bolesnika s bolestima jetre

<i>Kategorija</i>	<i>MELD zbroj</i>	<i>Vjerojatnost mortaliteta u tromjesečnom razdoblju (%)</i>
<i>V</i>	≥40	71-100
<i>IV</i>	30-39	52,6-74,5
<i>III</i>	20-29	19, 6-45,5
<i>II</i>	10-19	6-20
<i>I</i>	≤ 9	1,9-3,7

## 1.4.2. Klasifikacija stadija hepatocelularnoga karcinoma

### 1.4.2.1. TNM klasifikacija

TNM klasifikacija procjenjuje značajke primarnog tumora (T), prisutnost ili odsutnost zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i udaljene metastaze (M) (Tablica 3) (103).

Tablica 3. TNM klasifikacija hepatocelularnoga karcinoma

<i>Stadij</i>	<i>Oznaka</i>	<i>Opis</i>
<b><i>I</i></b>	T1, N0, M0	Jedan tumor ( bilo koje veličine), bez invazije krvnih žila
<b><i>II</i></b>	T2, N0, M0	Jedan tumor ( bilo koje veličine), s invazijom krvnih žila ili nekoliko tumora, svaki manji od 5 cm
<b><i>IIIA</i></b>	T3a, N0, M0	Nekoliko tumora od koji je bar jedan veći od 5 cm
<b><i>IIIB</i></b>	T3b, N0, M0	Jedan ili više tumora bilo koje veličine s invazijom većeg ogranka portalne ili hepaticke vene
<b><i>IIIC</i></b>	T4, N0, M0	Tumor ili tumori bilo koje veličine s invazijom susjednih organa (osim žučnog mjehura) ili s perforacijom visceralnog peritoneuma
<b><i>IVA</i></b>	Bilo koji T, N1, M0	Tumor ili tumori bilo koje veličine sa širenjem u obližnje (regionalne) limfne čvorove
<b><i>IVB</i></b>	Bilo koji T, bilo koji N, M1	Tumor ili tumori bilo koje veličine s udaljenim metastazama

TNM klasifikacija temelji se na histopatologiji i primjenjiva je u predviđanju preživljavanja za ograničen broj bolesnika koji su podvrgnuti resekciji. Klasifikacija ne nudi smjernice za resekciju i stoga ima vrlo mali značaj u procjeni bolesnika, osobito jer model ne nudi mogućnost procjene prognoze osnovne bolesti jetre (103).

## 1.4.2.2. Okuda klasifikacija

Okuda klasifikacija je prognostički model, a uključuje i značajke tumora kao i klinički stadij ciroze. Klasifikacija uključuje veličinu tumora (veći ili manji od 50% jetre), prisutnost ili odsutnost ascitesa te koncentraciju albumina i bilirubina u serumu (Tablica 4). U izvornom istraživanju medijan preživljavanja bolesnika, koji su podvrgnuti terapijskim postupcima, bio je 11,5 mjeseci za I fazu, 3 mjeseca za II fazu i 0,9 mjeseci za III fazu (103, 107).

Tablica 4. Okuda klasifikacija

<b>Čimbenici uključeni u klasifikaciju tumora</b>	- <i>Veličina tumora &gt; 50% jetre</i>
	- <i>Ascites</i>
	- <i>Albumin &lt; 30g/L</i>
	- <i>Bilirubin &gt; 51 umol/L</i>
<b>Stupanj I</b>	Niti jedan čimbenik nije prisutan
<b>Stupanj II</b>	Prisutna 1-2 čimbenika
<b>Stupanj III</b>	Prisutna 3-4 čimbenika

Najveći nedostatak Okuda sustava je njegova relativno gruba klasifikacija bolesnika u ranoj fazi, a unatoč nedostacima ostaje standard prema kojem se validiraju novi prognostički sustavi (102).

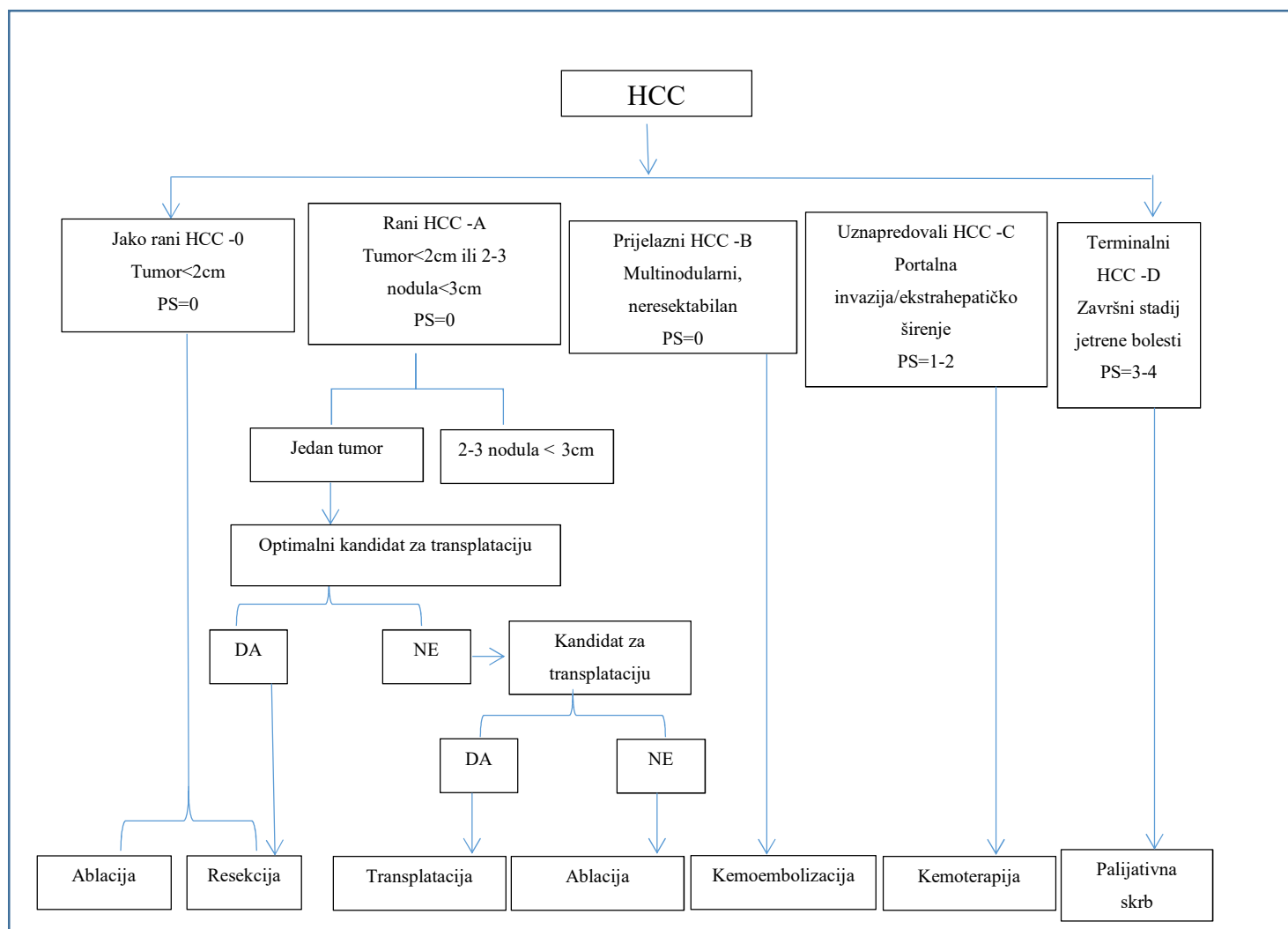
## 1.4.2.3. BCLC klasifikacija

BCLC (engl. *Barcelona-Clinic Liver Cancer*) klasifikacija danas se smatra standardom za procjenu HCC-a prema važećim smjernicama (55, 56).

BCLC uzima u obzir veličinu i opseg primarnog tumora, funkciju jetre i fiziološke čimbenike te uključuje Okuda i Child-Pugh stadij (103). BCLC predlaže odgovarajući način liječenja za svaku fazu bolesti, u rasponu od kurativnih terapijskih zahvata poput resekcije ili transplantacije za bolesnike u ranom stadiju do najbolje suportivne terapije za bolesnike u završnom stadiju bolesti (53, 108).

BCLC klasifikacija raspodjeljuje bolesnike s HCC-om u 5 stadija (0, A, B, C i D) i pruža procjenu medijana preživljenja te preporuke za terapijske mogućnosti za bolesnike u svakom stadiju (53, 103, 108):

1. BCLC stadij 0- jako rani HCC. Definiran je prisutnošću jednog tumora  $<2$  cm u promjeru bez vaskularne invazije ili satelita, kod bolesnika s dobrim zdravstvenim statusom i dobro očuvanom funkcijom jetre (CP A).
2. BCLC stadij A- rani HCC. Definiran je kod bolesnika s jednim tumorom  $>2$  cm ili 3 tumora  $<3$  cm u promjeru, kod bolesnika s dobrim zdravstvenim statusom, CP A ili B i Okuda stadijem I ili II.
3. BCLC stadij B- prijelazni HCC. Definiran je multinodularnim asimptomatskim tumorom bez invazije kod bolesnika s dobrim zdravstvenim statusom, CP A ili B i Okuda stadijem I ili II.
4. BCLC stadij C- uznapredovali HCC. HCC je definiran simptomima vezanima uz rak, makrovaskularnom invazijom ili proširenosti izvan jetre (uključenost limfnih čvorova ili metastaze) kod bolesnika s CP A ili B i Okuda stadijem I ili II.
5. BCLC stadij D-terminalna faza HCC. Bolesnike u terminalnoj fazi HCC karakterizira prisutnost tumora s jako lošim zdravstvenim statusom uz prateća ograničenja uzrokovana rakom



Slika 3. BCLC klasifikacija i terapijski postupci. *PS* – procjena zdravstvenog statusa. Preuzeto i prilagođeno prema Wai Ling Khoo TS i suradnicima (108).

#### 1.4.2.4. Ostali sustavi klasifikacije stadija hepatocelularnoga karcinoma

Uz opisane sustave klasifikacije koje su u širokoj upotrebi za procjenu stadija/prognoze HCC-a, niz je novih sustava kojima se pokušavaju nadomjestiti nedostaci postojećih (više ili manje uspješno), no BCLC klasifikacija je za sada jedini sustav klasifikacije s opsežnom prospektivnom validacijom i rutinski se koristi kao glavni stratifikacijski faktor u kliničkim ispitivanjima (53).

### **1.5. Liječenje hepatocelularnoga karcinoma**

Liječenje HCC-a je kompleksan proces koji zahtjeva razmatranje postojećeg tumora, prisutnih komorbiditeta, ali i ozbiljnost disfunkcije jetre (53).

Transplantacija jetre smatra se prvom linijom liječenja u bolesnika koji zadovoljavaju Milanski kriterij (1 tumor veličine <5 cm ili do 3 tumora, svaki promjera  $\leq 3$  cm) (109).

Resekcija HCC-a je preporučena terapijska opcija kada je moguće kirurški ukloniti tumor. Cilj resekcije je u potpunosti kirurški odstraniti tumorom zahvaćeni dio jetre. Idealni kandidati za ovaj zahvat su bolesnici s jednim tumorom (2 cm ili manje) i očuvanom funkcijom jetre (bez portalne hipertenzije) (110). Kod bolesnika kod kojih je uklonjen manji dio jetre i s očuvanom funkcijom jetre, tkivo se regenerira u naredna dva do tri tjedna. Kod cirotične jetre regeneracija je otežana, a izgledi postoperativnih komplikacija su veći što je teže oštećena funkcija cirotične jetre. Zbog toga je nužno predoperativno procijeniti funkciju jetre na temelju nekoliko kliničkih bodovnih sustava. Iako je kirurška resekcija jetre potencijalno terapijski postupak koji vodi izlječenju, kod 70% bolesnika se javlja recidiv HCC-a (111).

Lokoregionalna terapija (ablacija) smatra se prvom linijom terapije u bolesnika s ranim stadijem HCC-a, koji nisu kandidati za kirurške metode. Najčešće se primjenjuju radiofrekventna ablacija (RFA), mikrovalna ablacija i perkutana injekcija etanola (PEI) (53). Princip ablacije je indukcija nekroze tumora i to dovođenjem topline izravno u tumor u slučaju RFA i mikrovalne ablacije ili dolazi do koagulativne nekroze tumorskih lezija kao rezultat stanične dehidracije, denaturacije proteina i kemijske okluzije malih žila tumora kod primjene PEI (53).

Transarterijalna kemoembolizacija (TACE) se najčešće koristi i najprimjenjivanija je metoda liječenja kod intermedijarnog stadija HCC-a nepogodnog za resekciju (53). Metoda se temelji na intraarterijalnoj infuziji citotoksičnog agensa uz embolizaciju krvnih žila tumora što rezultira snažnim citotoksičnim i ishemičnim efektom. Kemoembolizacijom se postiže djelomičan odgovor, a uspješnost terapije ovisi o pažljivoj selekciji bolesnika za ovaj tip terapije (112).

Sustavna terapija HCC-a podrazumijeva oralnu primjenu sorafeniba i lenvatiniba koji su multikinazni inhibitori i imaju značajan doprinos u preživljenju bolesnika s uznapredovalim HCC-om. Indicirani su u bolesnika s dobro očuvanom funkcijom jetre (CP A) i uznapredovalim tumorom (BCLC C) te kod bolesnika kod kojih je došlo do progresije tumora nakon lokoregionalne terapije (113). Regorafenib (inhibitor multikinaze koji blokira aktivnost protein

kinaza uključenih u angiogenezu, onkogenezu i mikrookoliš tumora) se preporučuje kao terapija druge linije za bolesnike koji toleriraju i pokazuju napredak na sorafenibu s dobro očuvanom funkcijom jetre (CP A) (56). Faza 3 ispitivanja (IMbrave150) pokazala je značajno bolje ukupno preživljenje i preživljenje bez napredovanja bolesti s atezolizumabom (selektivni inhibitor PD-L1 – engl. *programmed death ligand 1*) u kombinaciji bevacizumabom (monoklonsko protutijelo na VEGF 18) u usporedbi sa sorafenibom u bolesnika s neresektabilnim HCC-om koji nisu prethodno liječeni (114).



## **2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

### 2.1. Ciljevi i hipoteza istraživanja

#### 2.1.1. Opći cilj istraživanja

Temeljni cilj ovog presječnog istraživanja je ispitati individualnu i kombiniranu dijagnostičku točnost AFP, AFP-L3, PIVKA-II, GP-3, SCCA1, CSTB, HGF i GALAD modela, kao potencijalnih tumorskih biljega za dijagnozu HCC-a kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre koristeći radiološke slikovne metode i/ili tkivno uzorkovanje (biopsiju tumora) kao "zlatni dijagnostički standard" u dijagnozi HCC-a.

#### 2.1.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. Verificirati referentne raspone AFP-L3, PIVKA II, GP3, SCCA1, CSTB, HGF i GALAD-a određivanjem njihove koncentracije u skupini zdravih ispitanika.
2. Odrediti optimalnu graničnu vrijednost, dijagnostičku specifičnost i osjetljivost AFP, AFP-L3, PIVKA II, GP3, SCCA1, CSTB, HGF i GALAD-a za dijagnozu HCC-a kod bolesnika s cirozom jetre alkoholne etiologije.
3. Odrediti optimalnu graničnu vrijednost, dijagnostičku specifičnost i osjetljivost za kombinacije biljega AFP, AFP-L3, PIVKA II, GP-3, SCCA1, CSTB i HGF za dijagnozu HCC-a kod bolesnika s cirozom jetre .
4. Utvrditi postoji li razlika u serumskoj koncentraciji ispitivanih biljega kod bolesnika s obzirom na funkcionalni stadij bolesti jetre prema Child-Pugh i MELD klasifikaciji
5. Utvrditi postoji li korelacija ispitivanih biljega sa stadijem HCC-a prema BCLC klasifikaciji

#### 2.1.3. Hipoteza

Kombinirano određivanje više tumorskih biljega povećava osjetljivost i specifičnost ne invazivne dijagnostike hepatocelularnoga karcinoma kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 83 ispitanika: 20 zdravih ispitanika, 31 bolesnik s alkoholnom cirozom (ALC) i 32 bolesnika s alkoholnom cirozom i HCC-om. Pomoću statističkog programa MedCalc Software (<https://www.medcalc.org;2019>) temeljem podataka ranije objavljenih istraživanja (83, 85, 97, 101) utvrđen je broj ispitanika potreban za ovo istraživanje. Prema načinjenoj analizi u istraživanje je trebalo uključiti najmanje 12 ispitanika po skupini, budući da se zaključivalo uz pogrešku prvog reda od 5% ( $p < 0,05$ ) za postizanje snage istraživanja od 90% ( $\beta = 0,1$ ). Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i svi su ispitanici potpisali informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava (23. prosinca 2008.) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (19. prosinca 2019.).

Bolesnici s alkoholnom cirozom i bolesnici s alkoholnom cirozom i HCC-om uzastopno su regrutirani iz skupine bolesnika hospitaliziranih na Odjelu za gastroenterologiju i hepatobilijarnu kirurgiju Kliničke bolnice Dubrava tijekom trogodišnjeg razdoblja (2009–2011). Dijagnoza alkoholne ciroze sa ili bez HCC-a utvrđena je temeljem fizikalnog pregleda, anamneze, laboratorijskih nalaza i nalaza slikovne obrade. Alkoholna bolest jetre utvrđena je u bolesnika s anamnestičkim podatkom o dugotrajnoj prekomjernoj konzumaciji alkohola ( $> 30$  g/dnevno za muškarce i  $> 20$  g/dnevno za žene) uz patološke vrijednosti biokemijskih jetrenih nalaza. Svim bolesnicima napravljene su osnovne laboratorijske pretrage potrebne za utvrđivanje funkcionalnog stadija bolesti jetre (alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (ALP), gama-glutamil transferaza (GGT), ukupni bilirubin, konjugirani bilirubin, ukupni proteini, albumin, kreatinin, K, Na, kompletna krvna slika (KKS), protrombinsko vrijeme (PV/INR)).

Prisutnost ciroze utvrđena je u slučaju postojanja tipičnih morfoloških promjena na metodama slikovnog prikaza (gruba struktura parenhima jetre, nodularne konture jetre, uvećan lobus caudatus, sužene i iregularne jetrene vene, proširena portalna vena, splenomegalija, postojanje portosustavnih venskih shuntova, edem stijene žučnjaka, ascites). Na HCC se posumnjalo u slučaju nalaza solidne žarišne promjene u jetri bilo kojom od slikovnih metoda. Dijagnoza HCC-a temeljila se na nalazu slikovnih pretraga provedenih uz intravensku aplikaciju kontrasta uz snimanje po višefaznom protokolu. U tipičnom slučaju HCC se u arterijskoj fazi dobro opacificira kontrastom, uz postojanje fenomena ispiranja (engl. „wash-out“) u venskoj fazi snimanja. U slučajevima gdje nalaz slikovnih pretraga nije bio tipičan učinjena je biopsija

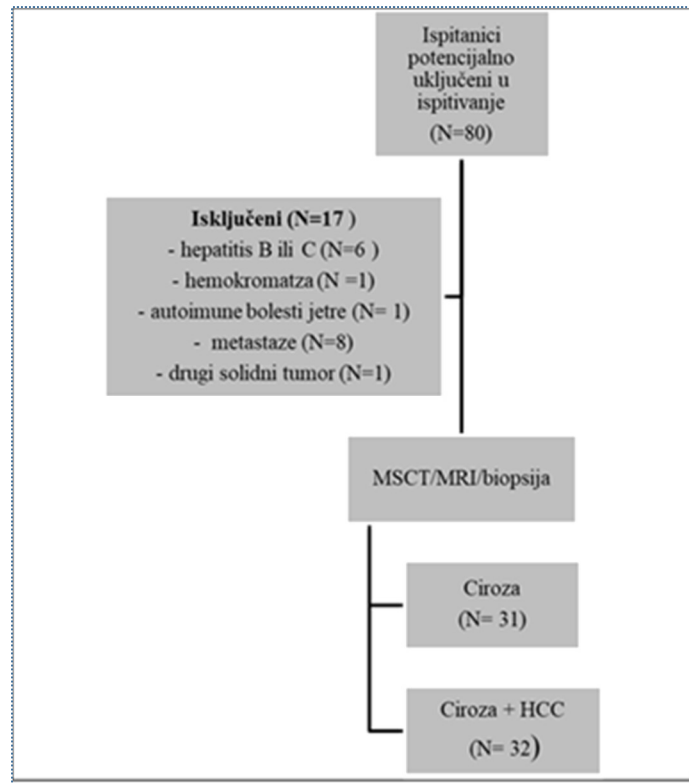
tumora i/ili jetre za definitivno utvrđivanje prirode žarišne promjene i stadija bolesti jetre (tj. utvrđivanje postojanja ciroze).

Nakon postavljanja konačne dijagnoze bolesnici su podijeljeni u podskupine. U istraživanje je uključeno i 20 zdravih ispitanika kako bi se verificirao referentni raspon ispitivanih biljega za dijagnozu HCC-a. Odsutnost ciroze kod zdravih ispitanika utvrđena je temeljem anamnestičkih podataka o nepostojanju kronične bolesti jetre, urednih vrijednosti biokemijskih jetrenih testova (bilirubin, AST, ALT, GGT, ALP), te urednog ultrazvučnog nalaza jetre.

Nakon inicijalnog probira bolesnika izvedeni su dodatni laboratorijski testovi za isključenje drugih uzroka kronične bolesti jetre (kronični virusni hepatitis B i C, autoimuni hepatitis, kronične kolestatske bolesti jetre, nasljedna hemokromatoza, Wilsonova bolest, deficit alfa-1-antitripsina).

Kriteriji isključivanja za sve ispitanike bili su: 1) ne-alkoholna etiologija ciroze (kronični hepatitis B ili C, autoimuni hepatitis, autoimune kolangiopatije, nealkoholna masna jetra, hemokromatoza, Wilsonova bolest, deficit alfa-1-antitripsina; 2) prisutnost metastaza; 3) prethodno liječenje HCC-a; 4) prisutnost drugog solidnog tumora, 5) terapija varfarinom ili antibioticima unatrag tri mjeseca.

CP i MELD klasifikacija korišteni su kako bi se procijenio funkcionalni stadij bolesti jetre za svakog bolesnika s alkoholnom cirozom jetre. CP je izračunat korištenjem serumske vrijednosti ukupnog bilirubina, albumina, PV / INR i prisutnosti i težini ascitesa i encefalopatije. MELD je izračunat korištenjem serumskih koncentracija bilirubina, kreatinina i INR u plazmi.



Slika 4. Dijagram toka studije

### 3.2. Uzorci

Za prikupljanje uzoraka periferne venske krvi korištene su epruvete s podtlakom firme BD (Becton Dickinson and Co, Italija).

Prvo uzorkovanje periferne venske krvi provedeno je za svakog sudionika nakon hospitalizacije u stanju gladovanja.

Savkom ispitaniku uzorkovane su četiri vrste epruveta: 1) epruveta s K<sub>2</sub>EDTA (za hematološke pretrage); 2) 2,7 ml epruveta s natrijevim citratom (puferirano s 0,109 mol /L natrijevog citrata za koagulacijske pretrage); 3) epruveta bez antikoagulansa s aktivatorom zgrušavanja (za određivanje AST, ALT, ALP, GGT, ukupnog bilirubina, albumina, i kreatinina), 4) epruveta s litijevim heparinom (za određivanje amonijaka).

Drugo uzorkovanje periferne venske krvi provedeno je nakon urađenih UZV, (MS)CT i/ili MRI i prije bilo kakvih terapijskih intervencija.

Svakom ispitaniku uzorkovane su dvije epruvete bez antikoagulansa s aktivatorom zgrušavanja (za određivanje proteina, metabolita, enzima, biljega metabolizma željeza, biljega hepatitisa, biljega autoimunih bolesti jetre, tumorskih biljega CEA, CA 19-9, kao dio standardnog kliničkog dijagnostičkog algoritma te AFP-a.

Preostali uzorci seruma su alikvotirani za određivanje AFP-L3, PIVKAI, GP3, SCCA1, CSTB i HGF, a alikvoti su pohranjeni na -80 °C u zamrzivaču DAIREI UPUL 580 (DAIREI EUROPE, Esbjerg N, Danska) do analize. Za određivanje koncentracije ovih parametara korišteni su ELISA komercijalni testovi (PIVKAI (Cusabio Biotech CO., LTD), GP3 (BlueGene Biotech CO. LTD., Shanghai, Kina), CSTB (Cloud-Clone Corp., Houston, USA), SCCA1 (USCN Life Science Inc., Houston, SAD), HGF (Abcam plc, Cambridge, UK)) prema uputama proizvođača.

Uzorci za koagulacijske i biokemijske pretrage centrifugirani su unutar 30 minuta od uzorkovanja na 1370xg 15 minuta, odnosno na 1370xg tijekom 10 minuta u Rotina 35 R Hettich centrifugi (Tuttlingen, Njemačka).

#### 3.3. Metode

U radu su korišteni sljedeći komercijalni reagensi i kompleti reagensa:

- kompletna krvna slika (Siemens, Frimley, Camberley, UK)
- PV, INR (Siemens, Deerfield, SAD)
- ukupni bilirubin, kreatinin, glukoza, urea, bakar, ceruloplazmin, željezo, nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC), feritin, AST, ALT, ALP, GGT, albumin, Latex CRP (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan)
- površinski antigen HBV, IgG + IgM protutijela na jezgru HBV i test protutijela na HCV (Siemens Diagnostics, Tarrytown, NY, SAD)
- biljezi autoimunih bolesti jetre: ANA, ASMA, LKM, AMA, ANCA (Euroimmun, Lübeck, Njemačka)
- CEA (Siemens Diagnostics, Tarrytown, NY, SAD).
- CA 19-9 (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan)

- AFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka)
- AFP-L3 (Cusabio Biotech CO., LTD)
- PIVKAI (Cusabio Biotech CO., LTD)
- GP3 (BlueGene Biotech CO. LTD., Shanghai, Kina)
- CSTB (Cloud-Clone Corp., Houston, SAD)
- SCCA1 (USCN Life Science Inc., Houston, SAD)
- HGF (Abcam plc, Cambridge, UK)

#### **3.3.1. Određivanje hematoloških parametara**

Iz uzorka pune krvi određen je ukupni broj eritrocita, eritrocitne konstante, ukupan broj trombocita, ukupan broj leukocita te apsolutni i relativni udjeli neutrofila i limfocita, koristeći automatiziranu metodu na hematološkom brojaču Advia 2120 (Siemens, Frimley, Camberley, UK)

#### **3.3.2. Određivanje koagulacijskih parametara**

Protrombinsko vrijeme (određeno kao omjer i INR) te koncentracija fibrinogena određeni su iz uzorka citratne plazme na automatskom koagulometru BCS XP koristeći originalne reagense proizvođača (Siemens, Deerfield, USA).

#### **3.3.3. Određivanje metabolita i supstrata**

Ukupni bilirubin, kreatinin, glukoza, urea, bakar, ceruloplazmin određeni su iz uzorka seruma metodom spektrofotometrije na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) koristeći originalne reagense proizvođača.

#### **3.3.4. Određivanje metabolizma željeza**

Koncentracije željeza i UIBC-a određene su iz uzorka seruma metodom spektrofotometrije na automatskom analizatoru AU2700 plus koristeći originalne reagense proizvođača.



Koncentracija ukupnog kapaciteta vezanja željeza (TIBC) određena je računskim putem koristeći izračun:  $TIBC = \text{željezo} + UIBC$ , dok je saturacija željeza izračunata koristeći izračun:  $\text{saturacija željeza (\%)} = \text{željezo} / TIBC \times 100$ .

Koncentracija feritina određena je također na automatskom analizatoru AU 2700 metodom turbidimetrije koristeći originalne reagense proizvođača.

#### 3.3.5. Određivanje enzima

Aktivnosti AST, ALT, ALP i GGT određene su iz uzorka seruma metodom spektrofotometrije na automatskom analizatoru AU2700 plus koristeći originalne reagense proizvođača.

#### 3.3.6. Određivanje proteina

Koncentracije albumina i C-reaktivnog proteina (CRP) određene su iz uzorka seruma metodom spektrofotometrije na automatskom analizatoru AU2700 plus koristeći originalne reagense proizvođača.

#### 3.3.7. Serološke pretrage

Površinski antigen HBV, IgG + IgM protutijela na jezgru HBV i test protutijela na HCV određeni iz uzorka seruma metodom kemiluminiscencije na imunokemijskom analizatoru Advia Centaur (Siemens Diagnostics, Tarrytown, NY) koristeći originalne reagense proizvođača.

Protutijela na ANA, ASMA, LKM, AMA, ANCA određene su u uzorku seruma metodom indirektno imunofluorescencije.

Na predmetnom stakalcu nalaze se fiksirani supstrat/i, koji se inkubiraju sa serumom bolesnika. Ukoliko u uzorku postoje specifična protutijela, ona će se vezati za antigene na supstratu. Nastali kompleks se vizualizira dodatkom sekundarnog anti-humanog protutijela obilježenog fluoresceinom i promatra fluorescentnim mikroskopom. Rezultati se izražavaju semikvantitativno, kao titar (posljednje razrjeđenje seruma koje je dalo pozitivnu fluorescenciju), osim za AMA, gdje se rezultati izražavaju kvalitativno.

#### 3.3.8. Određivanje tumorskih biljega

CEA je određen u uzorku seruma metodom kemiluminiscencije na automatskom analizatoru Advia Centaur koristeći originalne reagense proizvođača.

CA19-9 je određen u uzorku seruma metodom kemiluminiscencije na automatskom analizatoru DxI (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan) koristeći originalne reagense proizvođača.

AFP je određen u uzorku seruma metodom elektrokemiluminiscencije na automatskom analizatoru cobase411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) koristeći originalne reagense proizvođača.

Koncentracija AFP-L3 određena je „sandwich“ enzim imunoanalizom (ELISA) prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela specifičnog za AFP-L3 kojim je obložena mikrotitarska pločica. Nakon inkubacije s uzorkom ili kalibratorom te ispiranja, dodaje se sekundarno monoklonsko protutijelo konjugirano peroksidazom koje prepoznaje AFP-L3. Detekcija se odvija dodavanjem supstrata, a reakcija se prekida dodatkom otopine sulfatne kiseline. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od  $450 \pm 2$  nm, a koncentracija AFP-L3 u uzorku određuje se upotrebom kalibracijske krivulje.

Za izradu kalibracijske krivulje korištene su sljedeće koncentracije AFP-L3: 80 ng/mL, 40 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL, 4 ng/mL i 2 ng/mL. Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti izmjerenih apsorbancija za pojedinu koncentraciju na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije iznosi 0,6 ng/mL.

Koncentracija PIVKAI određena ELISA metodom prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela koje prepoznaje PIVKA II kojim je obložena mikrotitarska pločica. Nakon inkubacije s uzorkom ili kalibratorom i ispiranja, dodaje se sekundarno monoklonsko protutijelo konjugirano HRP-om peroksidazom iz hrena koje prepoznaje PIVKA II. Nakon ispiranja i uklanjanja nevezanog reagensa u reakcijsku smjesu dodaje se supstrat i razvija se boja čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji PIVKA II u uzorku. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine (kiseline) i očitava se apsorbancija na 450 nm, a potom na 540 ili 570 nm. Očitana apsorbancija na 540 ili 570 nm se oduzima od aposrbancije očitane na 450 nm, kako bi se korigirale eventualne interferencije vezane uz samu izvedbu mikrotitarske pločice. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja

standarda PIVKA II koji je sastavni dio ELISA kita. Originalni standard od 20 ng/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja pa je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka (20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,312 ng/mL i 0 ng/mL). Svako razrjeđenje određeno je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije iznosi 0,078 ng/mL.

GP3 određen je ELISA metodom prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji poliklonskog protutijela specifičnog za GP3 kojim je obložena mikrotitarska pločica. Uzorci (uzorak seruma ili kalibratori) i pufer inkubiraju se zajedno s konjugatom protutijela na GP3 obilježenog HRP-om. Nakon ispiranja dodaje se supstrat te se razvija plava boja. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine (sulfatne kiseline) i mjeri se apsorbancija na 450 nm. Intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji GP3 u uzorku s obzirom da se GP3 iz uzorka i GP3-HRP konjugat „natječu“ za vezna mjesta na protutijelu kojim je obložena pločica. Za izradu kalibracijske krivulje korišteni su standardi GP3 koji su sastavni dio ELISA kita. Kalibracijska krivulja sadrži 6 kalibracijskih točaka (10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,00 ng/mL, 0,5 ng/mL i 0 ng/mL). Svaki standard određen je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije je 0,1 ng/mL.

Koncentracija SCCA1 određena je ELISA metodom prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela koje prepoznaje SCCA, a kojim je obložena mikrotitarska pločica. Uzorci ili kalibratori dodaju se na mikrotitarsku pločicu zajedno s biotin-konjugiranim protutijelom specifičnim za SCCA1. Detekcija se odvija dodavanjem avidina vezanog na peroksidazu iz hrena (HRP). Detekcija SCCA1 molekule odvija se korištenjem 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) kao supstrata za HRP enzim. HRP reagira s otopinom supstrata i stvara se obojani produkt koji se stvara proporcionalno s koncentracijom SCCA1 prisutnog u kalibratoru ili uzorku seruma. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine (sulfatne kiseline) i mjeri se apsorbancija na  $450 \pm 10$  nm. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda SCCA1 koji je sastavni dio ELISA kita. Originalni standard od 50000 pg/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja pa je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka (5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL, 156 pg/mL, 78 pg/mL i 0 pg/mL). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu i

kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije iznosi 34 pg/mL.

Koncentracija CSTB određena je ELISA metodom prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela koje prepoznaje CSTB molekulu, a kojim je obložena mikrotitarska pločica. Uzorci ili kalibratori dodaju se na mikrotitarsku pločicu zajedno s biotin-konjugiranim protutijelom specifičnim za CSTB. Detekcija se odvija dodavanjem avidina vezanog na peroksidazu iz hrena (HRP). Detekcija CSTB molekule odvija se korištenjem 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) kao supstrata za HRP enzim. HRP reagira s otopinom supstrata i stvara se obojani produkt koji se stvara proporcionalno s koncentracijom CSTB prisutnog u kalibratoru ili uzorku seruma. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine (sulfatne kiseline) i mjeri se apsorbancija na  $450 \pm 10$  nm. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda SCCA1 koji je sastavni dio ELISA kita. Originalni standard od 200 ng/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja pa je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka (20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,312 ng/mL i 0 ng/mL). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije iznosi 0,134 ng/mL

Koncentracija HGF određena je ELISA metodom prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela koje prepoznaje HGF, a kojom je obložena mikrotitarska pločica. Nakon inkubacije s uzorkom ili kalibratorom, dodaje se sekundarno monoklonsko protutijelo koje prepoznaje HGF i koje je vezano za biotin. Nakon ispiranja nevezanog konjugata protutijela u reakciju se dodaje streptavidin konjugiran HRP-om (peroksidazom iz hrena). Mikrotitarske pločice se ponovo ispiru, a potom se dodaje 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) kao supstrat za HRP enzim. HRP reagira s otopinom supstrata i stvara se obojani produkt koji se stvara proporcionalno s koncentracijom HGF prisutnog u kalibratoru ili uzorku seruma. Reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine (kiseline) i mjeri se apsorbancija na 450 nm. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda HGF koji je sastavni dio ELISA kita. Originalni standard od 2000 pg/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja pa je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka (2000 pg/mL, 666,7 pg/mL, 222,2 pg/mL, 74,07 pg/mL, 24,7 pg/mL, 8,23 pg/mL, 2,74 pg/mL i 0 pg/mL). Svako razrjeđenje izmjereno je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je

nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa.

GALAD vrijednost izračunata je na temelju sljedeće jednadžbe:  $Z = -10,08 + 1,67 \times [\text{spol} (1 \text{ za muškarce, } 0 \text{ za žene})] + 0,09 \times [\text{dob}] + 0,04 \times [\text{AFP-L3\%}] + 2,34 \times \log[\text{AFP}] + 1,33 \times \log[\text{PIVKAI}]$ .

#### 3.3.9. Klasifikacija stadija jetrene bolesti

CP klasifikacija i MELD klasifikacija korišteni su kako bi se procijenio funkcionalni stadije bolesti jetre za svakog bolesnika s alkoholnom cirozom jetre.

CP je određena temeljem koncentracija bilirubina, albumina, vrijednosti INR, prisutnosti ascitesa i encefalopatije. Za svaki pokazatelj pojedinačno vrijednosti se numerički svrstavaju u jednu od tri skupine, a pojedina skupina donosi zadani broj bodova od 1 do 3, ukupni zbir bodova bolesnika svrstava u jednu od mogućih kategorija: A, B ili C (Tablica 1.)

MELD klasifikacija uključuje sljedeće pokazatelje: logaritam serumske koncentracije kreatinina i bilirubina te vrijednost INR. Maksimalan broj bodova je 40, pridružen broj bodova predviđa stopu mortaliteta i stratificira bolesnika na transplantacijskoj listi (Tablica 2). Formula za izračunavanje MELD bodova glasi:

$$\text{MELD bodovi} = 10 \times [0,957 \times \log\text{KREATININ} + 0,378 \times \log\text{BILIRUBIN} + 1,120 \times \log\text{INR} + 0,643]$$

Svim ispitanicima s HCC-om pridružen je TNM stadij bolesti i BCLC klasifikacija bolesti.

#### 3.3.10. Statistička analiza rezultata

Podaci su prikazani tablično i grafički. Histogrami te Kolmogorov-Smirnovljev test korišteni su za ispitivanje normalnosti razdiobe kvantitativnih podataka. Varijable koje su slijedile normalnu razdiobu prikazane su aritmetičkom sredinom ( $\bar{X}$ ) i standardnom devijacijom (SD), a varijable koje nisu slijedile normalnu razdiobu prikazane su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR) ili medijanom i 95 % intervalom pouzdanosti (95% CI). Dob je, neovisno o raspodjeli, prikazana medijanom i rasponom (minimum-maksimum). Kategoričke varijable su prikazane cijelim brojem i udjelom. Za testiranje statistički značajne razlike između dvije

skupine kvantitativnih varijabli s normalnom raspodjelom korišten je parametrijski studentov t-test, dok je značajnost razlike između dvije skupine varijabli čija je raspodjela odstupala od normalne, odnosno ako je broj ispitanika u skupini bio manji od 30, ispitana neparametrijskim Mann-Whitney testom. Statistički značajna razlika između više od dvije skupine kvantitativnih varijabli ispitana je korištenjem neparametrijskog Kruskal-Wallis testa (u svakoj skupini je bilo manje od 30 ispitanika). U slučaju utvrđivanja prisutnosti statistički značajne razlike između ispitivanih skupina, učinjeno je post hoc testiranje Student-Newman-Keulsovim testom, kojim je ispitano postojanje statistički značajne razlike između pojedinačnih parova skupina.

Za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina kategoričkih varijabli korišten je hi-kvadrat test.

Za utvrđivanje povezanosti (korelacije) varijabli koristila se korelacijska analiza (Spearmanov koeficijent korelacije). Statistički značajna povezanost (uz  $P < 0,05$ ) tumačena je sukladno Coltonovu kriteriju (r od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 nepostojanje povezanosti; r od 0,26 do 0,50 ili -0,26 do -0,50 slaba povezanost; r od 0,51 do 0,75 ili -0,51 do -0,75 umjerena do dobra povezanost; r od 0,76 do 1 ili -0,76 do -1 vrlo dobra do izvrsna povezanost).

Dijagnostička točnost ispitivanih tumorskih biljega u diskriminaciji prisutnosti HCC-a, ispitana je ROC analizom (ROC, engl. *receiver operating characteristics*) i usporedbom površina ispod ROC krivulje. Nakon toga je učinjena multivarijatna regresijska analiza. Dodana diskriminacijska vrijednost ispitanih modela uspoređena je korištenjem dobivenih površina ispod krivulja (DeLong et al.).

Statistička analiza izrađena je statističkim programom MedCalc Statistical Software verzija 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019))

Razina statističke značajnosti postavljena je na  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Opis skupine ispitanika

Ispitanici uključeni u ispitivanje podijeljeni su u tri skupine: 1) Skupina bolesnika s HCC-om i ALC (HCC+ALC); 2) Skupina bolesnika s ALC bez HCC-a (ALC); i 3) Skupina zdravih ispitanika (HV). Demografski podaci ispitanika uključenih u istraživanje prikazani su u tablici (Tablica 5).

Tablica 5. Demografski podaci ispitanika

	<i>HCC+ALC</i>	<i>ALC</i>	<i>HV</i>	<i>P</i>	<i>P*</i>
<b>Broj ispitanika</b>	32	31	20	/	/
<b>Dob (godine)</b>	67 (53-79)	64 (42-81)	68 (56-88)	0,226	0,491
<b>Spol (Mušakrci:žene)</b>	28:4	27:4	15:5	0,419	0,962

*p* – statistička razlika između HV, HCC+ALC i ALC; *p\**- statistička razlika između HCC+ALC i ALC skupine ispitanika

Ispitivane skupine obuhvaćaju podjednak broj muškaraca i žena, iako je broj muškaraca uključen u ispitivanje znatno viši, bez statistički značajne razlike u starosnoj dobi među ispitivanim skupinama.



#### 4.2. Stadiji jetrene bolesti kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre

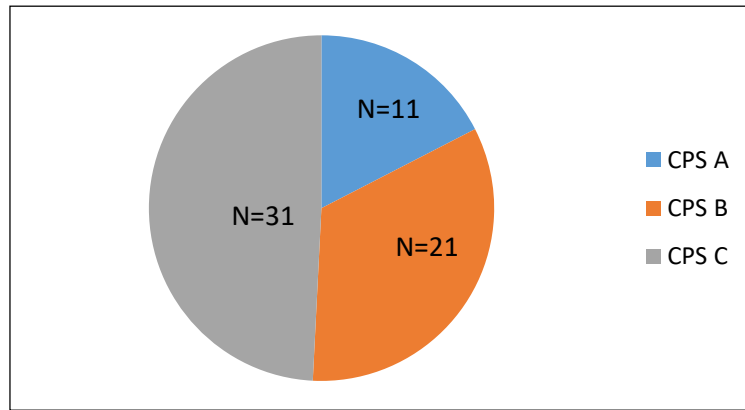
Za sve bolesnike s cirozom, neovisno o prisutnosti HCC-a određeni su CP i MELD stadiji bolesti, a rezultati su prikazani u tablici (Tablica 6).

Tablica 6. CP i MELD klasifikacija ciroze

	<i>ALC+HCC</i>	<i>ALC</i>	<i>P</i>
<b><i>CP bodovi</i></b>	9 (6-10)	10 (7-13)	<b>0,044</b>
<b><i>CP (A:B:C)</i></b>	11:8:13	0:13:18	<b>0,002</b>
<b><i>MELD bodovi</i></b>	16 (2-36)	18 (8-33)	0,106
<b><i>MELD (I:II:III:IV:V)</i></b>	10:16:5:1:0	2:19:9:1:0	<b>0,036</b>

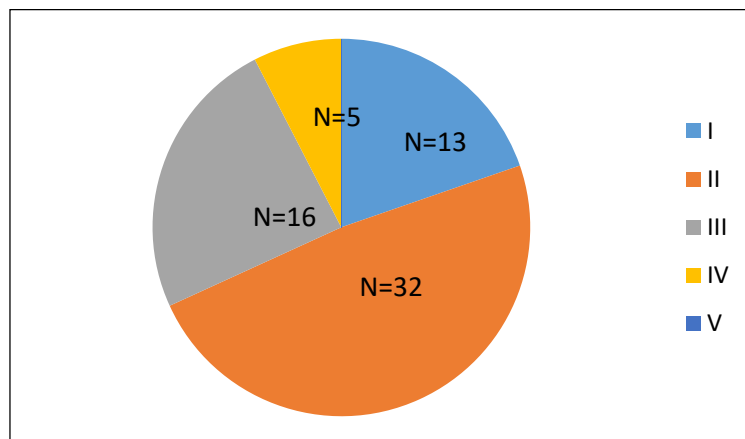
\* *Bodovi za stadij ciroze: CP A 5-6; CP B 7-9; CP C 10-15; MELD I ≤9; MELD II 10-19, MELD III 20-29; MELD IV 30-39; MELD V ≥ 40; CP (A, B, C) - Child-Pugh stadij (A, B,C); MELD – model za završni stadij bolesti jetre*

Iako je prosječan MELD zbroj za bolesnike s ALC-om i ALC i HCC-om bez statistički značajne razlike, kada su im pridružene kategorije uočena je statistički značajna razlika, gdje bolesnici s HCC-om prema CP i MELD klasifikaciji imaju blaži oblik jetrene bolesti.



Slika 5. Zastupljenost pojedinih Child-Pugh stadija kod svih bolesnika s cirozom (N ukupno =63)

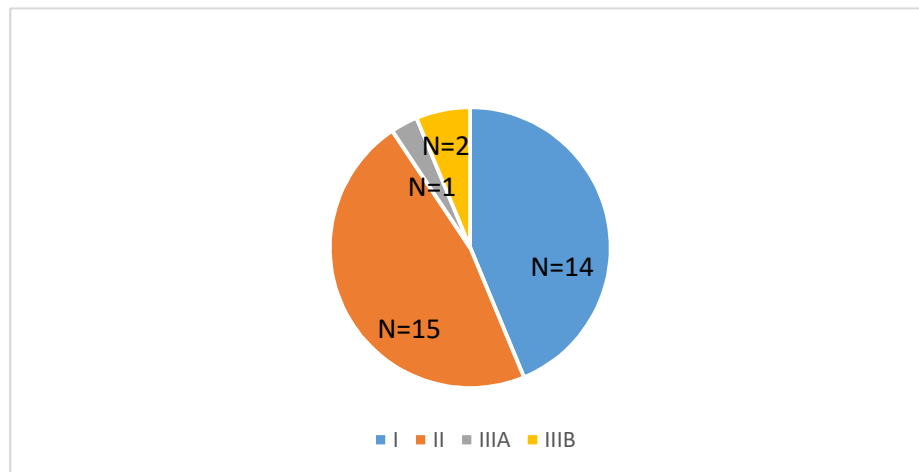
Zastupljenost pojedinih CP i MELD kategorija kod svih bolesnika s cirozom prikazana je na slikama (Slika 5 i Slika 6). Vidljivo je da su najzastupljeniji bili bolesnici s CP C i MELD kategorijom II.



Slika 6. Zastupljenost pojedinih MELD kategorija kod svih bolesnika s cirozom (N ukupno =63)

### 4.3. Stadij hepatocelularnoga karcinoma kod bolesnika

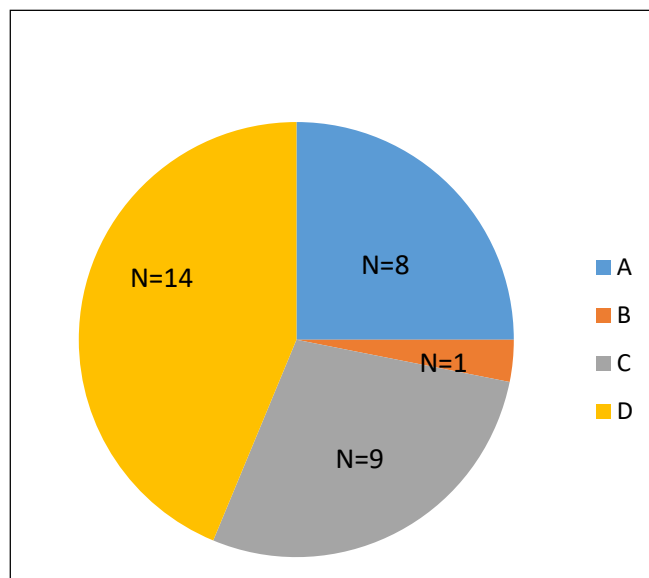
Svi bolesnici s HCC-om klasificirani su prema TNM klasifikaciji karcinoma (Slika 7).



Slika 7. TNM klasifikacija bolesnika (N ukupno = 32)

Bolesnici s HCC-om uključeni u istraživanje bili su klasificirani u stadije I, II, IIIA i IIIB TNM klasifikacije. Najzastupljeniji su bili bolesnici sa stadijima I (N=14) i II (N=15) (Slika 7), odnosno T1 N0 M0 (jedan tumor bilo koje veličine bez invazije krvnih žila) i T2 N0 M0 (jedan tumor bilo koje veličine s invazijom krvnih žila ili nekoliko tumora svaki manji od 5 cm).

Također, učinjena je i BCLC klasifikacija bolesti prikazana na slici (Slika 8).



Slika 8. BCLC klasifikacija bolesnika s hepatocelularnim karcinomom

Iako su neki bolesnici s HCC-om, otkriveni u stadiju ograničene tumorske bolesti, s obzirom na stadij ciroze većina ih je BCLC klasifikacijom svrstana u završne stadije C i D (Slika 8).

#### 4.4. Hematološki i koagulacijski parametri

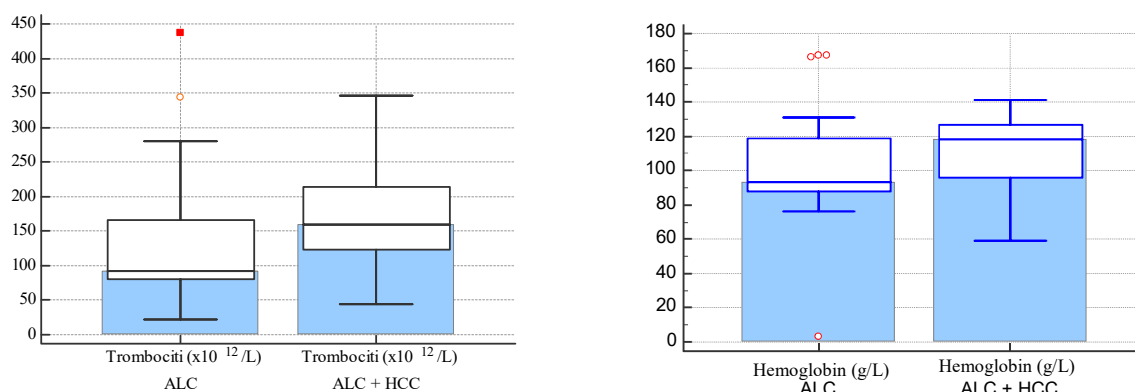
Vrijednosti određenih hematoloških i koagulacijskih parametara prikazani su Tablici 7. Utvrđena je statistički značajna razlika između broja eritrocita i trombocita, relativnog udjela neutrofila i limfocita te omjera neutrofila i limfocita, koncentracije hemoglobina, MPV (srednjeg volumena trombocita), PV, INR-a i koncentracije fibrinogena između zdrave skupine i ispitanika s ALC sa ili bez HCC-a.

Tablica 7. Prikaz hematoloških i koagulacijskih parametara svih ispitanika

	<i>HCC+ALC</i>	<i>ALC</i>	<i>HV</i>	<i>P</i>	<i>P*</i>
<b>HEMATOLOŠKI PARAMETRI</b>					
<i>Eritrociti</i> ( $\times 10^6/L$ )	3,76* ( $\pm 0,58$ )	3,61* ( $\pm 1,24$ )	4,71* ( $\pm 0,41$ )	<0,001	0,558
<i>MCV</i> ( <i>fL</i> )	92,9* ( $\pm 9,66$ )	94,8* ( $\pm 11,58$ )	90,6* ( $\pm 5,05$ )	0,355	0,483
<i>Hemoglobin</i> ( <i>g/L</i> )	118 (96-127)	93 (88-119)	143 (133-146)	<0,001	0,030
<i>Leukociti</i> ( $\times 10^6/L$ )	6,35 (4,40-8,60)	7,90 (6,20-10,60)	6,35 (5,55-7,20)	0,073	0,072
<i>Neutrofili</i> (%)	70,3 (59,4-77,1)	67,5 (64,1-72,0)	57,3 (51,7-61,3)	0,002	0,443
<i>Limfociti</i> (%)	16 (10,7-26,2)	17,8 (11,6-24,3)	29,9 (23,7-35,8)	<0,001	0,675
<i>Neutrofili/Limfociti</i>	4,6 (2,3-7,4)	3,9 (2,7-6,2)	1,9 (1,4-2,5)	<0,001	0,908
<i>Trombociti</i> ( $\times 10^{12}/L$ )	159 (124-214)	92 (81-166)	251 (188-321)	<0,001	0,014
<i>MPV</i> ( <i>fL</i> )	9 (8,9-9,7)	8,6 (8,3-9,4)	8,1 (7,5-9,0)	0,007	0,060
<b>KOAGULACIJSKI PARAMETRI</b>					
<i>PV</i> (%)	61 (49-78)	47 (43-59)	90 (88-95)	<0,001	0,106
<i>INR</i>	1,36 (1,14-1,72)	1,5 (1,31-1,68)	1,05 (1,04-1,10)	<0,001	0,145
<i>Fibrinogen</i> ( <i>g/L</i> )	2,7 (2,3-3,1)	2,4 (1,8-2,6)	3,1 (3,0-3,8)	0,002	0,063

*p* – statistička razlika između *HV*, *HCC+ALC* i *ALC*; *p\** Statistička razlika između *HCC+ALC* i *ALC* skupine ispitanika; \*središnjica prikazana aritmetičkom sredinom, a raspon *SD*

Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji hemoglobina i broju trombocita između skupine bolesnika s ALC bez HCC-a i bolesnika s ALC s HCC-om (Slika 9).



Slika 9. Prikaz usporedbe medijana i 95% CI između skupine bolesnika s ALC-om i ALC –om i HCC-om za koncentraciju hemoglobina i broj trombocita.

Koncentracija hemoglobina i broj trombocita viši su kod bolesnika s HCC-om.

#### 4.5. Biokemijski parametri

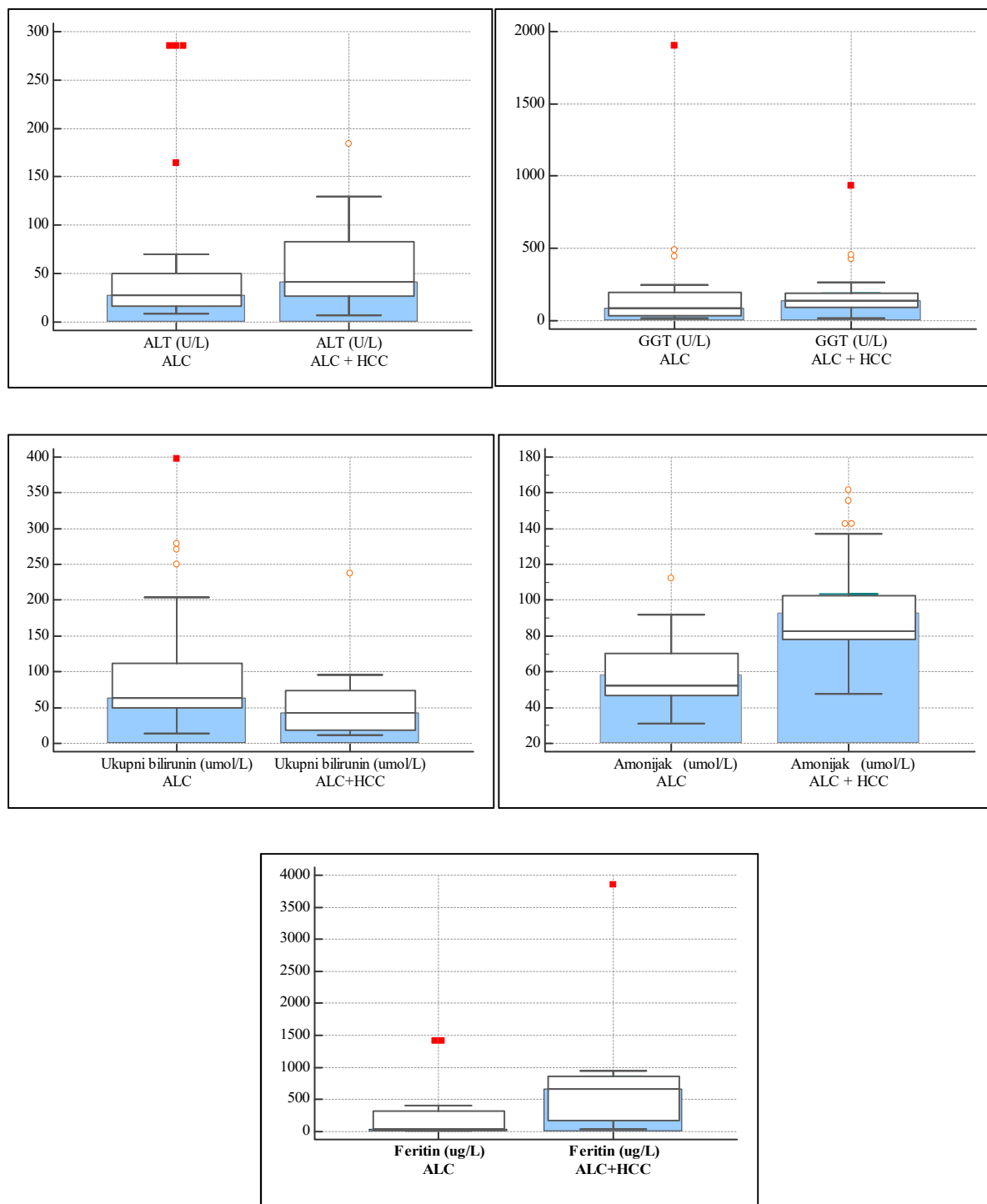
Vrijednosti određenih biokemijskih parametara prikazane su Tablici 8. Utvrđena je statistički značajna razlika aktivnosti svih određivanih enzima, koncentracije albumina, CRP-a, ukupnog bilirubina, amonijaka, TIBC-a, feritina te CEA i CA19-9 između zdravih ispitanika te bolesnika s ALC sa ili bez HCC-a.

Tablica 8. Prikaz biokemijskih parametara ispitanika

	<i>HCC+ALC</i>	<i>ALC</i>	<i>HV</i>	<i>P</i>	<i>P*</i>
	<b>ENZIMI</b>				
<b>AST</b> (U/L)	71 (46-164)	49 (44-98)	20 (16-25)	<b>&lt;0,001</b>	0,145
<b>ALT</b> (U/L)	42 (27-83)	28 (17-50)	18 (14-26)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,037</b>
<b>ALP</b> (U/L)	120 (96-180)	107 (80-141)	65 (52-73)	<b>&lt;0,001</b>	0,466
<b>GGT</b> (U/L)	141 (94-191)	84 (35-197)	24 (19-29)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,043</b>
	<b>PROTEINI</b>				
<b>Albumin</b> (g/L)	29 (25-30)	27 (24-29)	43 (42-45)	<b>&lt;0,001</b>	0,072
<b>CRP</b> (mg/L)	17,2 (12,2-22,4)	19,9 (9-39)	1,9 (1,2-2,6)	<b>&lt;0,001</b>	0,815
	<b>METABOLITI I SUPSTRATI</b>				
<b>Glukoza</b> (mmol/L)	6,9 (6,0-8,5)	6,0 (5,7-6,9)	4,9 (4,6-6,0)	<b>0,002</b>	0,218
<b>Ukupni bilirubin</b> (umol/L)	42,8 (18,8-73,7)	63 (49-112)	12,2 (9,6-16,7)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,020</b>
<b>Urea</b> (mmol/L)	5,7 (4,7-7,6)	8,0 (5,6-9,7)	5,1 (4,2-6,6)	0,160	0,221
<b>Kreatinin</b> (umol/L)	90,5 (71,5-111,5)	93 (73,7-108)	96,5 (82,5-107)	0,625	0,554
<b>Amonijak</b> (umol/L)	82,6 (47,8-102,3)	52,5 (46,7-70,2)	23,6 (22,0-37,6)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	<b>METABOLIZAM ŽELJEZA</b>				
<b>Željezo</b> (umol/L)	12,4 (7,0-24,6)	11,1 (4,5-20,3)	18,5 (15,7-22,3)	0,134	0,347
<b>UIBC</b> (umol/L)	25,3 (2,5-54,9)	20,5 (11,9-34,2)	35,9 (32,5-50,9)	0,125	1,000
<b>TIBC</b> (umol/L)	40,4 (30,9-63,5)	30,2 (24,7-45,3)	59,4 (55,4-64,9)	<b>0,012</b>	0,138
<b>Saturacija željeza</b> (%)	33 (10-91)	25 (17-45)	34 (23-41)	0,929	0,913
<b>Feritin</b> (ug/L)	665 (175-660)	33 (28-315)	119 (71-188)	<b>0,029</b>	<b>0,013</b>
	<b>TUMORSKI BILJEZI</b>				
<b>CEA</b> (ng/mL)	3,1 (2,1-4,6)	2,1 (1,6-3,3)	1,05 (0,6-1,6)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,053</b>
<b>CA 19-9</b> (kIU/L)	19,6 (10,4-100,5)	36,0 (23,2-53,0)	5,0 (3,0-14,0)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,083</b>

*p* – statistička razlika između *HV*, *HCC+ALC* i *ALC*; *p\** Statistička razlika između *HCC+ALC* i *ALC* skupine ispitanika;

Dodatno, za aktivnosti ALT, GGT te koncentracije ukupnog bilirubina, amonijaka i feritina utvrđena je statistički značajna razlika između bolesnika s ALC i bolesnika s ALC i HCC (Slika 10).



Slika 10. Prikaz usporedbe medijana i 95% CI za aktivnosti ALT, GGT i koncentracije bilirubina i feritina te amonijaka između skupine bolesnika s ALC-om i ALC-om i HCC-om.



Iz prikaza je vidljivo da su aktivnosti ALT, GGT te koncentracije amonijaka i feritina više kod bolesnika s ALC-om i HCC-om, dok je koncentracija bilirubina viša kod bolesnika s ALC-om bez HCC-a.

Kada se medijani koncentracija za CEA i CA 19-9 usporede s graničnim vrijednostima koje navode proizvođači reagensa (CEA: 0 - 5 ug/L, CA19-9: 0 - 35 kIU/L ) može se utvrditi da obje skupine ispitanika imaju medijan koncentracija unutar referentnih intervala za CEA, dok za CA19-9 skupina bolesnika s ALC bez HCC-a ima medijan vrijednosti iznad referentnog intervala.

#### 4.6. Tumorski biljezi kod zdravih ispitanika

Kod zdravih ispitanika (N = 20) koncentracija potencijalnih tumorskih biljega je ispitana kako bi se verificirale granične vrijednosti ispitivanih biljega. Rezultati su prikazani u tablici (Tablica 9).

Tablica 9. Serumske koncentracije ispitivanih biljega u skupini zdravih ispitanika

<i>Biljeg</i>	<i>AFP</i> <i>ng/mL</i>	<i>AFP-</i> <i>L3/AFP</i> <i>(%)</i>	<i>PIVKA II</i> <i>ug/L</i>	<i>GALAD</i>	<i>GP3</i> <i>ug/L</i>	<i>CSTB</i> <i>ug/L</i>	<i>SCCA1</i> <i>ug/L</i>	<i>HGF</i> <i>ug/L</i>
<i>Medijan</i>	4,11	22,5	0,69	-3,16	1,65	18,4	0,54	0,20
<i>Raspon</i>	1,80-26,95	3-57	0,08-4,84	-5,97-(-0,6)	0,30-2,10	9,76-83,75	0,15-13,53	0,12-0,65

## 4.7. Tumorski biljezi kod bolesnika s alkoholnom cirozom sa i bez HCC-a

Medijani koncentracija svih ispitivanih tumorskih biljega i utvrđivanje statističke značajnosti njihove razlike kod bolesnika s alkoholnom cirozom sa ili bez HCC-a, prikazani su u tablici (Tablica 10).

Tablica 10. Ispitivani tumorski biljezi kod ispitanika s alkoholnom cirozom sa ili bez HCC-a.

	<i>ALC + HCC</i>	<i>ALC</i>	<i>P</i>
<i>AFP (ng/mL)</i>	99,73 (19,60-520,32)	3,60 (2,86-3,77)	<b>&lt;0,001</b>
<i>AFP-L3 /AFP (%)*</i>	29 (28-65,5)	31 (25-33)	0,460
<i>PIVKAI</i> (ug/L)	14,46 (2,36-473,19)	0,57 (0,27-1,25)	<b>&lt;0,001</b>
<i>GP3 (ug/L)</i>	5,55 (4,15-11,40)	6,90 (4,30-10,00)	0,441
<i>CSTB (ug/L)</i>	82,03 (25,68-129,47)	114,90 (51,40 –282,20)	0,099
<i>SCCA1 (ug/L)</i>	11,27 (2,56-19,51)	13,34 (7,61-16,23)	0,501
<i>HGF (ug/L)</i>	0,57 (0,31-0,80)	0,59 (0,33-1,36)	0,710
<i>GALAD</i>	2,89 (1,29-14,0)	-3,82 (-4,13-(-3,4))	<b>&lt;0,001</b>

\*Kod bolesnika s koncentracijom AFP-a 20-200 ng/mL (Medijan, IQR)

Udio AFP-L3 u ukupnoj koncentraciji AFP-a utvrđen je samo za one bolesnike kod kojih je koncentracija AFP-a bila viša od 20 ng/mL, a niža od 200 ng/mL jer je jedino u ovom slučaju %AFP-L3 informativan (9 ispitanika s ALC i HCC i 5 ispitanika s ALC).

Testiranjem je utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji AFP-a i PIVKAI kod bolesnika s ALC i bolesnika s ALC i HCC-om, kao i GALAD statističkog modela u čiji su izračun uz spol i dob uključene izmjerene koncentracije AFP, %AFP-L3 i PIVKAI. Medijani

koncentracija AFP-a, PIVKAI<sup>II</sup> i GALAD-a kod bolesnika s cirozom bez HCC-a su unutar raspona koncentracija zdravih ispitanika, dok su u bolesnika s HCC-om značajno povišeni. Za ostale ispitivane tumorske biljege (AFP-L3/AFP, GP3, CSTB, SCCA1 i HGF) je utvrđena viša koncentracija u obje ispitivane skupine s ALC-om (sa i bez HCC-a) u odnosu na koncentracije kod zdravih ispitanika, ali nije utvrđena statistički značajna razlika između bolesnika s ALC i ALC i HCC-om..

U cilju utvrđivanja utjecaja funkcionalnog stadija ciroze jetre na serumske koncentracije tumorskih biljega, ispitani su samo oni biljezi za koje se u Tablici 10 pokazalo da im se koncentracije ne razlikuju ovisno o prisutnosti HCC-a (GP3, CSTB, SCCA1 i HGF). U ovu analizu uključeni su svi bolesnici (N=63) sa alkoholnom cirozom bez obzira na prisutnost HCC-a jer on nije utjecao na koncentraciju ovih serumskih biljega. Potencijalni utjecaj funkcionalnog stadija bolesti jetre na ostale biljege (AFP, PIVKAI<sup>II</sup> i GALAD) nema smisla testirati jer je njihova serumska koncentracija pod presudnim utjecajem prisutnosti HCC-a, te bi se testiranje moralo provesti zasebno unutar skupine bez HCC-a i posebno unutar skupine sa HCC-om, koje bi se dodatno trebale razdijeliti u manje skupine prema funkcionalnom stadiju bolesti jetre, što bi rezultiralo premalim brojem uključenih ispitanika za pouzdanu statističku analizu. U tablici (Tablica 11) prikazana je usporedba serumskih koncentracija potencijalnih tumorskih biljega ovisno u funkcionalnom stadiju bolesti jetre prema CP klasifikaciji.

Tablica 11. Koncentracija tumorskih biljega u odnosu na Child-Pugh stadij ciroze jetre (N = 63)

	<i>CPS A</i> (N=11)	<i>CPS B</i> (N=21)	<i>CPS C</i> (N=31)	<i>P</i>
<b>GP3</b> (ug/L)	4,60 (3,60-6,50)	5,30 (4,00-8,10)	7,80 (5,43-12,28)	<b>0,013</b>
<b>CSTB</b> (ug/L)	22,11 (19,85-35,81)	68,30 (54,78-140,00)	132,50 (96,04-312,46)	<b>&lt;0,001</b>
<b>SCCA1</b> (ug/L)	1,90 (0,65-2,80)	13,30 (3,35-18,94)	13,39 (11,8-16,3)	<b>0,001</b>
<b>HGF</b> (ug/L)	0,31 (0,30-0,50)	0,54 (0,43-1,07)	0,70 (0,35-0,99)	0,062

Rezultati ukazuju da su koncentracije GP3, CSTB i SCCA1 statistički značajno različite u različitim stadijima ciroze. Post hoc analiza je pokazala da je za GP3 statistički značajna razlika u koncentraciji između stadija CP A i CP C, a medijani koncentracija CSTB i SCCA1 su statistički značajno različite između stadija CP A u odnosu na stadije CP B i CP C, dok se koncentracije za niti jedan ispitivani biljeg statistički značajno ne razlikuju između stadija CP B i CP C.

Ispitana je i povezanost koncentracija navedenih tumorskih biljega s funkcionalnim stadijem ciroze prema MELD klasifikaciji (Tablica 12).

Tablica 12. Povezanost koncentracija GP3, CSTB i SCCA 1 i HGF s funkcionalnim statusom bolesti jetre mjerenim MELD bodovnim sustavom.

<i>Biljeg</i>	<i>MELD stadij</i>	
	<i>Spearman r<sup>2</sup></i> <i>(95 % CI)</i>	<i>P</i>
<b>GP3</b> ( <i>ug/L</i> )	0,207 (-0,043-0,433)	0,103
<b>CSTB</b> ( <i>ug/L</i> )	<b>0,622</b> (0,442-0,754)	<0,001
<b>SCCA 1</b> ( <i>ug/L</i> )	<b>0,584</b> (0,393-0,726)	<0,001
<b>HGF</b> ( <i>ug/L</i> )	0,285 (0,036-0,501)	0,026

CSTB i SCCA1 pokazuju dobru pozitivnu povezanost s funkcionalnim statusom bolesti jetre mjerenim MELD bodovnim sustavom.

#### 4.8. Dijagnostička točnost tumorskih biljega u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma

Dijagnostička točnost svih određivanih tumorskih biljega testirana je analizom ROC krivulja. Za svaki ispitivani biljeg utvrđene su optimalne granične koncentracije, dijagnostička osjetljivost, dijagnostička specifičnost te ukupna dijagnostička točnost postavljanja dijagnoze HCC-a kod bolesnika s ALC (izražena kao površina ispod krivulje – AUC). Rezultati su prikazani u tablici (Tablica 13). Dijagnostička točnost AFP-a ispitana je kod granične koncentracije od 20 ng/mL koja se prema smjernicama koristi za postavljanje dijagnoze AFP-a.

Tablica 13. Dijagnostička točnost pojedinačnih tumorskih biljega u dijagnozi HCC-a kod bolesnika s ALC.

<i>Tumorski biljeg</i>	<i>Granična koncentracija</i>	<i>Dijagnostička osjetljivost</i>	<i>Dijagnostička specifičnost</i>	<i>AUC</i>	<i>P</i>
<i>AFP</i> (ng/mL)	20	62,5 (43,7-78,9)	100 (88,8-100)	0,813 (0,694-100)	<b>&lt;0,001</b>
<i>AFP-L3/AFP*</i> (%)	33	44,4 (13,7-78,8)	100 (47,8-100)	0,622 (0,333-0,859)	0,464
<i>PIVKAIH</i> (ug/L)	2,06	81,3 (63,6-92,8)	96,8 (83,3-99,9)	0,903 (0,802-0,963)	<b>&lt;0,001</b>
<i>GP3</i> (ug/L)	≤5,8	53,13 (34,7-70,9)	64,52 (45,4-80,8)	0,556 (0,426-0,682)	0,448
<i>CSTB</i> (ug/L)	≤131,29	78,12 (60,0-90,7)	48,39 (30,2-66,9)	0,621 (0,490-0,740)	0,092
<i>SCCA1</i> (ug/L)	≤12,30	59,4 (40,6-76,3)	67,7 (48,6-83,3)	0,549 (0,419-0,675)	0,520
<i>HGF</i> (ug/L)	≤1,32	90,62 (75,0-98,0)	25,81 (11,9-44,6)	0,527 (0,397-0,654)	0,715

\*Kod bolesnika s koncentracijom AFP-a 20-200 ng/mL

#### 4.9. Razlikovanje kliničkog stadija HCC-a prema BCLC klasifikaciji

Evaluirana je diskriminativna sposobnost pojedinih biljega za razlikovanje kurabilnog od inkurabilnog stadija bolesti. Kurabilni stadiji HCC-a su prema BCLC klasifikaciji BCLC 0-A, dok su B, C i D inkurabilni, tj. moguće su samo terapijske opcije koje produžuju život, ali ne nude mogućnost izlječenja. U tom smislu kao surogat ovako kategoriziranih bolesnika mogu poslužiti i Milanski kriteriji gdje je temeljni klasifikacijski čimbenik tumorska masa,

procijenjena kroz veličinu i broj tumora. Svi bolesnici s HCC-om raspoređeni su u dvije skupine prema Milanskim kriterijima. U prvu skupinu (unutar Milanskih kriterija) svrstani su bolesnici s jednim tumorom veličine  $< 5$  cm ili do 3 tumora, svaki  $\leq 3$  cm. U drugu skupinu (izvan Milanskih kriterija) svrstani su svi ostali bolesnici s HCC-om (Tablica 14).

Tablica 14. Usporedba koncentracije tumorskih biljega kod bolesnika s HCC-om u odnosu na stadij bolesti procijenjen prema BCLC klasifikaciji. Kurabilni HCC (BCLC stadiji 0-A, unutar Milanskih kriterija); Inkurabilni HCC (BCLC stadiji B-D, izvan Milanskih kriterija).

	<i>HCC</i> <i>Unutar Milanskih</i> <i>kriterija</i> <i>(N=14)</i>	<i>HCC</i> <i>Izvan Milanskih</i> <i>kriterija</i> <i>(N=18)</i>	<i>P</i>	<i>R</i>
<i>AFP (ng/mL)</i>	14,8 (8,19-652,50)	129,3 (68,04-988,90)	<b>0,042</b>	0,366 (0,02-0,63)
<i>AFP-L3/AFP (%)</i>	54,5 (28,90-76,42)	64 (31,18-70,00)	0,732	/
<i>PIVKAII (ug/L)</i>	12,93 (3,64-605,70)	15,99 (2,35-358,56)	0,761	/
<i>GP3 (ug/L)</i>	4,9 (4,50-8,13)	6,85 (4,20-11,42)	0,621	/
<i>CSTB (ug/L)</i>	68,30 (21,90-146,30)	104,68 (35,80 –129,80)	0,909	/
<i>SCCAI (ug/L)</i>	10,73 (2,57-22,37)	11,62 (2,29-17,32)	0,849	/
<i>HGF (ug/L)</i>	0,63 (0,32-0,72)	0,52 (0,35-0,90)	0,849	/
<i>GALAD</i>	1,52 (-2,3-17,76)	4,63 (1,48-29,17)	0,119	/

Od svih ispitanih biljega jedino su koncentracije AFP-a pokazale slabu, ali statistički značajnu povezanost s veličinom tumora kod bolesnika s HCC-om, odnosno slabu diskriminacijsku sposobnost za razlikovanje kurabilnog od nekurabilnog stadija bolesti.

#### 4.10. Dijagnostička točnost kombinacije potencijalnih tumorskih biljega u dijagnozi hepatocelularnoga karcinoma

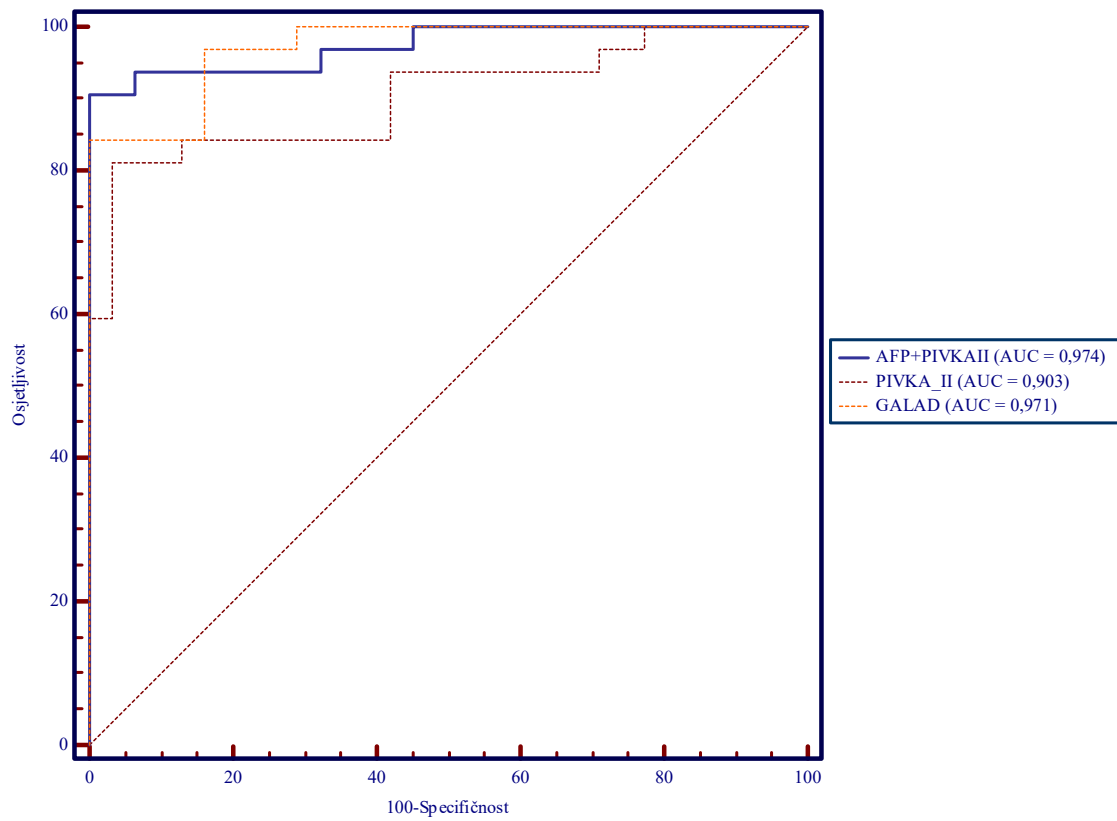
Kako bi utvrdili imaju li kombinacije tumorskih biljega dodanu vrijednost u odnosu na određivanje pojedinačnih biljega u dijagnozi HCC-a, logističkom regresijom ispitali smo kombinaciju AFP-a i PIVKAI koji su individualno pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji kod bolesnika s ALC i bolesnika s ALC i HCC-om, te GALAD modela koji uključuje određivanje koncentracije AFP-a, PIVKAI, %AFP-L3, a u model ulaze i spol i dob. Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Dijagnostička točnost kombinacije tumorskih biljega

<i>Kombinacija tumorskih biljega</i>	<i>Dijagnostička osjetljivost</i>	<i>Dijagnostička specifičnost</i>	<i>AUC</i>	<i>P</i>
<b>AFP+PIVKA II</b>	90,6 (75,0-98,0)	100 (88,8-100)	0,974 (0,90-0,99)	<b>&lt;0,001</b>
<b>GALAD</b>	84,4 (67,2-94,7)	100 (88,8-100)	0,971 (0,894-0,997)	<b>&lt;0,001</b>

Kombinacija s najboljom dijagnostičkom točnosti je kombinacija AFP i PIVKAI s AUC od 0,974, dok je AUC GALAD modela 0,971. Iako kombinacija AFP i PIVKA II ima nešto bolju dijagnostičku točnost, površine ispod krivulja ove kombinacije biljega i GALAD modela nisu pokazale statistički značajnu razliku ( $p = 0,856$ ). Površina ispod krivulje kombinacije AFP i PIVKAI statistički je značajno viša od AUC samog PIVKAI koji je pojedinačni biljeg s najvišom dijagnostičkom točnosti ( $p = 0,031$ ). Također, GALAD model nije pokazao statistički značajno višu površinu ispod krivulje u odnosu na PIVKA II ( $p = 0,086$ ). ROC krivulje svih ispitanih kombinacija biljega PIVKAI i GALAD-a prikazane su na Slici 11, a usporedba površina ispod krivulja ispitana je DeLong testom.





Slika 11. Prikaz usporedbe analize ROC krivulja za izvedbu kombinacija biljega: AFP+PIVKaII, GALAD modela i PIVKA II.

\*Usporedba površina ispod krivulja (DeLong et al):  $p(\text{AFP+PIVKaII vs PIVKAII}) = 0,031$ ;  $p(\text{AFP+PIVKaII vs GALAD}) = 0,856$ ;  $p(\text{PIVKaII vs GALAD}) = 0,086$ ;

## **5. RASPRAVA**

Ovim istraživanjem provedeno je ispitivanje dijagnostičke točnosti tumorskih biljega u dijagnozi HCC-a kod ALC jetre. Tumorski biljezi čija je dijagnostička točnost ispitivana u ovom radu uključuju: AFP, AFP-L3, PIVKAI, GP3, CSTB, SCCA1 i HGF, a korišten je i GALAD score koji uključuje kombinaciju AFP, AFP-L3 i PIVKAI.

PIVKAI i AFP pokazali su vrlo dobru dijagnostičku točnost u diferencijalnoj dijagnozi HCC-a kod bolesnika s ALC-om. PIVKAI kod granične koncentracije od 2,06 ug/L ima dijagnostičku osjetljivost od 81,3 % (63,6 - 92,8 %), dijagnostičku specifičnost od 96,8 % (83,3 - 99,9 %) uz AUC od 0,903 (0,802 - 0,963). AFP kod granične koncentracije od 20 ng/mL pokazuje dijagnostičku osjetljivost od 62,5 % (43,7 - 78,9 %), dijagnostičku specifičnost od 100 % (88,8-100 %) i AUC od 0,813 (0,694 - 0,997).

Ranija istraživanja ovih biljega uključivala su heterogenu etiološku skupinu bolesnika, koja je uglavnom obuhvaćala virusnu etiologiju HCC-a. Jang ES i suradnici ispitivali su dijagnostičku točnost tumorskih biljega za dijagnozu HCC-a, kod bolesnika s pretežno HBV etiologijom HCC-a, a AFP je pokazao dobru dijagnostičku točnost te je kod granične koncentracije od 20 ng/mL, dijagnostička osjetljivost iznosila 62,0 %, dijagnostička specifičnost 90,2 % uz AUC od 0,786. Za PIVKAI kod granične koncentracije od 10 ug/L osjetljivost je iznosila 51 %, specifičnost 91,2 % uz AUC od 0,711 (115). Marrero i suradnici ispitivali su dijagnostičku točnost AFP-a i PIVKAI kod bolesnika s pretežno HCV etiologijom jetrene ciroze i HCC-a, a njihovi rezultati pokazali su da je kod granične koncentracije od 20 ng/mL dijagnostička osjetljivost AFP-a 59 %, dijagnostička specifičnost 90 %, a PIVKAI je kod granične koncentracije od 2,58 ug/L pokazao osjetljivost od 74 % i specifičnost od 70 % (116). Kada usporedimo rezultate našeg istraživanja kod bolesnika s isključivo alkoholnom etiologijom ciroze i HCC-a, možemo zaključiti da AFP kod istih graničnih koncentracija pokazuje nešto bolju dijagnostičku točnost u odnosu na virusnu etiologiju HCC-a. Međutim, za donošenje zaključka o tome ima li etiologija bolesti utjecaja na mjere dijagnostičke točnosti AFP-a potrebne su dodatne studije koje bi usporedile njegovu dijagnostičku točnost u paralelnim balansiranim skupinama bolesnika s HCC-om.

AFP je tumorski biljeg čije je određivanje uključeno u rutinsku obradu kod sumnje na HCC, neovisno o etiologiji. Međutim, AFP se uglavnom koristi kao dijagnostički biljeg, a ne u praćenju visokorizične populacije i detekciji ranog HCC-a. Razlozi suboptimalne izvedbe AFP-a kao biljega za praćenje razvoja HCC-a kod bolesnika s cirozom su: 1) koncentracije AFP-a u bolesnika s cirozom mogu odražavati aktivnost osnovne bolesti jetre (npr. virusnog hepatitisa)

ili razvoj HCC-a; 2) samo mali dio tumora u ranoj fazi ima povišenu koncentraciju AFP-a. Iz navedenih razloga AFP, unatoč visokoj dijagnostičkoj specifičnosti i osjetljivosti, nije uključen u smjernice za praćenje visokorizične populacije (56). Preporučena granična vrijednost u dijagnozi HCC-a za AFP je 20 ng/mL. Pomicanjem granične vrijednosti na više koncentracije povećava se specifičnost, međutim smanjuje se osjetljivost biljega za dijagnozu HCC-a (56).

Uspoređujući naše rezultate s ranije spomenutim istraživanjima možemo zaključiti da PIVKAI kod virusne etiologije bolesti ima višu optimalnu graničnu koncentraciju i lošiju dijagnostičku točnost. Ovi zaključci su u suglasju i sa zaključkom meta analize Zhu R i suradnika koji su u ispitivanje uključili 12 različitih studija koje su ispitivale dijagnostičku izvedbu PIVKAI (117). Studije uključene u meta analizu uglavnom su uključivale bolesnike s virusnom etiologijom HCC-a, a objedinjena dijagnostička točnost iznosila je 71 %, dok je objedinjena dijagnostička specifičnost iznosila 84 %. Autori u zaključku, temeljem dobivenih rezultata navode da su razlike u mjerama dijagnostičke točnosti PIVKAI kod različitih studija moguće rezultat utjecaja različitih etioloških čimbenika i navode potrebu za bolje dizajniranim studijama kako bi se potvrdila ova pretpostavka (117).

Iako PIVKAI nije biljeg koji je preporučan smjericama za pretraživanje i dijagnozu HCC-a, na skupini ispitanika na kojoj je provedeno ovo istraživanje, PIVKAI se pokazao boljim tumorskim biljekom za dijagnozu HCC-a kod ALC u usporedbi s AFP-om.

Prema dosadašnjim istraživanjima izoforma AFP-L3 je specifičnija za dijagnozu HCC-a od ukupne koncentracije AFP-a, povezana je s agresivnijim HCC-om i predviđa lošiji ishod bolesti, a istraživanja također sugeriraju da je korisna za predviđanje rizika od razvoja HCC u bolesnika s kroničnom bolešću jetre (80, 81). Međutim, iako se radi o specifičnom biljegu, AFP-L3 je izoforma ukupnog AFP-a (nije nezavisni biljeg) i njegovo određivanje opravdano je u slučaju povišenog AFP-a zbog čega mu je dijagnostička osjetljivost niska (118), što je vidljivo i u našem istraživanju. U našem ispitivanju udio AFP-L3 u ukupnoj koncentraciji AFP-a nije značajno različit između dvije ispitivane skupine. Međutim, pri interpretaciji ovih rezultata, potrebno je uzeti u obzir da AFP i AFP-L3, u našem istraživanju, nisu određivani istim metodama, a različite imunokemijske metode detektiraju različite epitope antigena te se razlikuju u specifikacijama analitičke specifičnosti i osjetljivosti, a i podložne su različitim interferencijama (119). Sve navedeno može imati utjecaj na rezultate dobivene u ovom istraživanju. Osim toga rezultati našeg ispitivanja ograničeni su i brojem ispitanika s

koncentracijom AFP-a u „sivoj zoni“ od 20-200 ng/mL, gdje je opravdano određivanje AFP-L3 u cilju povećanja specifičnosti samog AFP-a (120).

Iako su serumske koncentracije ostalih potencijalnih tumorskih biljega statistički značajno više u svih bolesnika s ALC-om (sa i bez HCC-a) u usporedbi sa zdravim ispitanicima, nije utvrđena značajna razlika između njihovih koncentracija u bolesnika sa i bez HCC-a.

GP3 se nakon AFP i PIVKA II u dosadašnjim istraživanjima pokazao kao najperspektivniji tumorski biljeg u dijagnozi HCC-a. Yang i suradnici su objavili rezultate meta-analize kojom se ispitala dijagnostička točnost GP3 u dijagnozi HCC-a dominantno virusne etiologije. U meta-analizu uključili su 22 studije dijagnostičke točnosti GP3. Među njima, 18 studija pokazalo je da je serumski GP3 specifičan biljeg za dijagnozu HCC-a, a objedinjena osjetljivost i specifičnost za GP3, u analiziranim istraživanjima, iznosila je 69 % i 93 %. Preostale četiri studije objavile su proturječne rezultate, koji nisu uzrokovani rasnom razlikom, statusom infekcije HBV i HCV ili reagensima za određivanje, već su posljedica uključivanja bolesnika s cirozom jetre kao kontrolne skupine (121). S obzirom da je i naša studija pokazala da bolesnici s cirozom jetre alkoholne etiologije imaju koncentracije GP3 više od zdravih ispitanika, nameće se zaključak da sama progresija ciroze jetre utječe na koncentraciju GP3. Nadalje, rezultati našeg istraživanja pokazali su da je koncentracija GP3 statistički značajno viša kod bolesnika s cirozom u CP stadiju C nego kod bolesnika s cirozom u CP stadiju A ( $p = 0,013$ ).

Rezultati naše studije mogu se usporediti i s rezultatima istraživanja dijagnostičke točnosti GP3 u dijagnozi HCC-a kod bolesnika s ne-virusnom etiologijom ciroze (alkoholna ciroza i NAFLD) koje su proveli Beale i suradnici, gdje također nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama GP3 u bolesnika s cirozom bez HCC-a i bolesnika s cirozom i HCC-om (122).

Rezultati evaluacije dijagnostičke točnosti SCCA1 i HGF pokazali su slične karakteristike kao i rezultati za GP3. Naime, koncentracije oba biljega značajno su više kod bolesnika s ALC nego li kod zdravih ispitanika, ali nije utvrđena statistički značajna razlika kod bolesnika s ALC i bolesnika s ALC i HCC-om.

Dosadašnje studije pokazale su kontroverzne rezultate dijagnostičke izvedbe SCCA1. Giannelli i suradnici su utvrdili da su serumske koncentracije SCCA1 više kod bolesnika s HCC-om nego li u bolesnika s cirozom virusne etiologije i nije utvrđena povezanost serumske koncentracije SCCA1 sa stadijem ciroze (123). Beale i suradnici su utvrdili da su serumske koncentracije SCCA1 više kod bolesnika s cirozom jetre ne-virusne etiologije, ali nisu utvrdili statistički

značajnu razliku u koncentraciji između bolesnika s cirozom i bolesnika s HCC-om. Dijagnostička točnost pokazala je osjetljivost od svega 18 % i specifičnost od 73,2 % (122). Soyemi i suradnici su ispitivali dijagnostičku izvedbu SCCA1 kod zdravih ispitanika i bolesnika s HCC-om virusne etiologije i utvrdili da je kod granične koncentracije od 0,368 ug/L dijagnostička osjetljivost 75% i specifičnost 26,7 % uz AUC od 0,588 (124). Rezultati našeg ispitivanja usporedivi su s rezultatima studije Beale i suradnika (122) koja ne uključuje bolesnike s virusnom etiologijom ciroze. S obzirom da su naši rezultati pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji SCCA1 između CP stadija A i CP stadija B i C ciroze ( $p = 0,001$ ), kao i povezanost njegove serumske koncentracije s MELD bodovnim sustavom ( $R = 0,584$ ), nameće se zaključak da u cirozi jetre alkoholne etiologije SCCA1 progresivno raste s pogoršanjem funkcionalnog stadija bolesti jetre, te bi možda mogao predstavljati patofiziološki biljeg povezan s progresijom bolesti jetre. Kada usporedimo medijane koncentracije biljega kod bolesnika s alkoholnom cirozom sa i bez HCC-a u našem istraživanju (11,27 ug/L i 13,34 ug/L) s onima u istraživanju Soyemi i suradnika (124) možemo zaključiti da su kod HCC-a alkoholne etiologije koncentracije SCCA1 u serumu znatno više od koncentracija kod bolesnika s HCC-om virusne etiologije.

Yamagamim i suradnici ispitivali su dijagnostičku izvedbu HGF-a kod bolesnika s HCV etiologijom jetrene bolesti i HCC-a. Njihov zaključak je bio da je koncentracija HGF-a u serumu znatno viša kod bolesnika s HCC-om nego kod ispitanika bez karcinoma. Također, zaključili su da koncentracije HGF-a u serumu više od 0,31 ug/L snažno upućuju na prisutnost HCC-a (101). Rezultati našeg istraživanja nisu u skladu s ovim rezultatima. Medijan vrijednosti kod zdravih ispitanika bio je 0,20 ug/L, međutim medijani koncentracije HGF-a kod bolesnika s ALC sa ili bez HCC-a iznosili su 0,57 ug/L, odnosno 0,59 ug/L. Nadalje medijani koncentracija HGF-a bili su viši u višim CP stadijima ciroze (iako nije utvrđena statistički značajna razlika), a utvrđena je i slaba povezanost s MELD stadijem ciroze ( $r = 0,285$ ).

Koncentracije CSTB u našem ispitivanju značajno su niže kod zdravih ispitanika nego li kod bolesnika s cirozom. Iako su zabilježene više koncentracije kod bolesnika s ALC bez HCC-a u odnosu na bolesnike s ALC i HCC-om, ova razlika nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,099$ ). Istraživanje koje su proveli Lee i suradnici kod bolesnika s HBV etiologijom ciroze i HCC-a, pokazalo je dobru dijagnostičku točnost CSTB u dijagnostici HCC-a (97). Naše istraživanje kod alkoholne etiologije ciroze i HCC-a nije potvrdilo rezultate ove studije. Međutim, zanimljivo je da su u istraživanju Lee i suradnika medijani koncentracija CSTB bili značajno niži od medijana koncentracija u bolesnika uključenih u naše istraživanje (7,8 ug/L i

10,8 ug/L vs. 114,90 ug/L i 82,03 ug/L). Osim toga MELD bodovi bolesnika s cirozom i HCC-om u istraživanju Lee i suradnika bili su prosječno niži od MELD bodova bolesnika u našem istraživanju, a rezultati našeg istraživanja pokazali su i dobru pozitivnu povezanost koncentracije CSTB s funkcionalnim stadijem ciroze prema MELD klasifikaciji ( $r=0,622$ ).

Ispitali smo i dijagnostičku točnost kombinacije potencijalnih biljega u dijagnozi HCC-a kod ciroze jetre alkoholne etiologije. U ispitivanje su uključeni biljezi koji su temeljem rezultata našeg ispitivanja bili značajno povišeni kod bolesnika s ALC-om i HCC-om u odnosu na bolesnike samo s ALC-om: AFP i PIVKAI.

Kombinacija ova dva biljega u našem je istraživanju imala je značajno višu AUC (0,974 vs. 0,903) u odnosu na samo određivanje PIVKA II ( $p=0,031$ ), koji se pokazao najboljim individualnim biljegom za dijagnozu HCC-a kod ALC-a. Kombinacija biljega značajno je povećala dijagnostičku osjetljivost individualnih biljega u dijagnozi HCC-a, a upravo visoka dijagnostička osjetljivost je nužan kriterij za testove koji bi se koristili kao testovi probira kod visokorizične populacije za razvoj HCC-a.

Osim AFP i PIVKAI izvrsnu dijagnostičku točnost u našem istraživanju pokazao je i GALAD (AUC=0,971) statistički model koji kombinira određivanje koncentracije AFP-a, %AFP-L3 i PIVKAI sa spolom i dobi bolesnika za procjenu vjerojatnosti prisutnosti HCC-a u bolesnika s kroničnom bolesti jetre.

Yang i suradnici utvrdili su da je AUC GALAD modela za otkrivanje ranog stadija HCC-a, kod heterogene etiologije ciroze i HCC-a, visok i iznosio je 0,92 (uz graničnu vrijednost od -1,18, osjetljivost 92% te specifičnost 79%) (88), što je usporedivo s rezultatima dobivenim u našem ispitivanju gdje je, uz istu optimalnu graničnu vrijednost, zabilježena dijagnostička osjetljivost od 84,4% i specifičnost od 100 % uz AUC 0,971. Rezultati gore navedene studije pokazali su da model GALAD ima veću dijagnostičku točnost za otkrivanje HCC-a u usporedbi s određivanjima koncentracije AFP, %AFP-L3 i PIVKAI biljega pojedinačno ili u kombinaciji (88).

U retrospektivnoj multicentričnoj kohortnoj studiji (8 centara u Njemačkoj) (125), ispitivana je dijagnostička točnost GALAD modela u dijagnozi HCC-a. U studiju su bili uključeni bolesnici s NASH sa ili bez HCC-a. AUC GALAD modela u razlikovanju ove dvije skupine bolesnika iznosio je 0,960 i bio je značajno viši od AUC-a samih biljega uključenih u izradu modela. Kada su u analizu dijagnostičke točnosti GALAD modela uzeti samo bolesnici s NASH i

bolesnici s NASH i HCC-om unutar Milanskih kriterija GALAD je imao AUC od 0,910. Autori su također ispitali dijagnostičku točnost GALAD modela na ispitanicima u prospektivnoj studiji (koja se provodila u Japanu). Studija je uključivala kohortu bolesnika s NASH-om kod koje se redovito provodilo pretraživanje za razvoj HCC-a. U razdoblju od 5 godina kod 26 ispitanika se razvio HCC, a utvrđeno je da je GALAD bio viši kod onih bolesnika s NASH koji su razvili HCC u odnosu na one koji nisu i to čak 36 mjeseci prije dijagnoze HCC-a (125).

Rezultati navedenih istraživanja ukazuju da je GALAD model prikladan za rano otkrivanje HCC-a svih etiologija, a multicentričnom prospektivnom studijom (faza IV) potrebno je potvrditi može li se GALAD model koristiti u budućnosti kao sastavni dio algoritama za probir HCC-a u rizičnih bolesnika (125).

Rezultati našeg ispitivanja kod alkoholne etiologije ciroze i HCC-a utvrdili su da kombinacija određivanja AFP i PIVKAIII ima viši AUC od GALAD modela, iako nije zabilježena statistički značajna razlika ( $p=0,856$ ), a sam GALAD model nije pokazao bolju dijagnostičku točnost u odnosu na PIVKA II (0,086).

Od ostalih pretraga koje su korištene kao dio standardne obrade bolesnika sa sumnjom na HCC u našem istraživanju, koncentracije CA19-9 također nisu bile statistički značajno različite u bolesnika s ALC i bolesnika s ALC i HCC-om, ali su značajno više kod svih bolesnika s cirozom nego li kod zdravih ispitanika, a kod bolesnika s cirozom bez HCC-a medijan koncentracija je viši od preporučenih referentnih intervala proizvođača korištenog reagensa. Povišene koncentracije CA19-9 u serumu mogu biti sekundarno povezane s nekroinflamatornim procesima, promjenama malih žučnih vodova, prisutnošću regenerativnih čvorova i hiperprodukcijom sirovog kolagena, što su sve tipični znakovi aktivnosti nekroinflamatornih i reparatornih procesa u jetri (126). Istraživanje koje su proveli Bertino i suradnici pokazalo je da je koncentracija CA19-9 povišena u bolesnika s cirozom jetre virusne etiologije i koncentracije su bile značajno više kod bolesnika s višim stadijima ciroze jetre (126). Međutim, kada su usporedili koncentracije CA19-9 kod bolesnika s cirozom HBV etiologije s jedne strane i HCV etiologije s druge, rezultati su pokazali da su koncentracije CA 19-9 više kod bolesnika s HCV etiologijom bolesti (126). Medijan koncentracija kod bolesnika s cirozom HCV etiologije bio je 51,7 kIU/L, a kod bolesnika s cirozom HBV etiologije 48,4 kIU/L (126). Naši rezultati pokazali su medijan koncentracija kod ciroze jetre alkoholne etiologije od 36 kIU/L, dakle niže koncentracije od onih zabilježenih kod ciroza virusne



etiologije. Singhal i suradnici su također proveli istraživanje kod bolesnika s cirozom jetre u kojem su zaključili da su koncentracije CA19-9 više kod uznapredovale ciroze (127).

Ispitana je i diskriminativna sposobnost pojedinih biljega za razlikovanje kurabilnog od inkurabilnog stadija HCC-a. Prema BCLC klasifikaciji kurabilni stadiji su BCLC 0-A, dok su B, C i D inkurabilni, tj. moguće su samo terapije koje produžuju život, ali ne nude mogućnost izlječenja. U tom smislu kao surogat ovako kategoriziranih bolesnika mogu poslužiti i Milanski kriteriji gdje je temeljni klasifikacijski čimbenik tumorska masa, procijenjena kroz veličinu i broj tumora. U našem istraživanju jedino je AFP bio značajno viši ( $p=0,042$ ) kod bolesnika s većom tumorskom masom (izvan Milanskih kriterija) pri čemu nije bilo značajne razlike u kliničkom stadiju ciroze između bolesnika unutar ili izvan Milanskih kriterija ( $p = 0,503$  za Child-Pugh i  $p=0,457$  za MELD funkcionalni stadij ciroze).

S obzirom da je BCLC klasifikacija HCC-a najšire prihvaćena klasifikacija, koja procjenjuje stadij HCC-a i mogućnost terapijskih opcija, na većoj skupini ispitanika potrebno je provesti potvrdu korisnosti biljega u odabiru bolesnika koji su kandidati za kurativne terapijske opcije.

Dosadašnja istraživanja o korelaciji AFP-a i veličine tumora dala su različite pa čak i kontradiktorne rezultate. Bai i suradnici su u svom istraživanju, koje nije uključivalo prikaz etioloških čimbenika, zaključili da je AFP nezavisni prediktivni čimbenik veličine tumora (128). Abbasi i suradnici su u svoje istraživanje uključili bolesnike s virusnom etiologijom HCC-a i također zaključili da koncentracija AFP-a snažno korelira s veličinom tumora (129). Temeljem ovih ispitivanja, uključujući i rezultate naših ispitivanja, AFP bi mogao biti nezavisni prediktivni čimbenik veličine tumora neovisno o etiologiji, što je u suglasju i sa dosadašnjim spoznajama o onkogenim učincima AFP-a. AFP potiče proliferaciju stanica (130) te potiče pokretljivost stanica i invazivni rast nekih HCC staničnih linija in vitro, kao i stvaranje metastaza u mišjem modelu (131).

Zanimljivo je da u našem istraživanju PIVKAIi nije pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji između skupina bolesnika s HCC-om unutar i izvan Milanskih kriterija, iako se pokazao kao „najbolji“ biljeg za diferenciranje ciroze od HCC-a. Istraživanje koje su proveli Zakhary i suradnici kod bolesnika s HCV etiologijom HCC-a pokazalo je da PIVKAIi pokazuje značajnu korelaciju s veličinom tumora za razliku od AFP-a (132). Međutim, istraživanja su potvrdila da sama alkoholna etiologija jetrene bolesti može imati utjecaj na koncentracije

PIVKAI, odnosno da sam unos etanola može imati utjecaj na povećanu sintezu PIVKAI, mehanizmima koji se razlikuju od mehanizama u HCC-u virusne etiologije (133).

U ovom istraživanju određeni su i laboratorijski parametri koji su uobičajeno uključeni u programe dijagnoze i praćenja bolesti jetre.

Od hematoloških parametara, koncentracija hemoglobina i broj trombocita bili su značajno viši u skupini s cirozom i HCC-om ( $p = 0,030$  i  $p = 0,014$ ) u odnosu na skupinu s cirozom bez HCC-a, a obje su bile značajno niže nego li kod zdravih ispitanika ( $p < 0,001$ ). Također je broj trombocita bio niži s rastućim stupnjem ciroze jetre, iako razlika nije statistički značajna ( $p = 0,338$ ). Broj trombocita je od ranije prepoznati čimbenik rizika za razvoj HCC-a u bolesnika s cirozom (134). Naime, trombociti su biljeg težine portalne hipertenzije koja se uobičajeno pogoršava s progresivnim pogoršanjem funkcionalnog stadija ciroze. Treba uočiti da su u našem istraživanju bolesnici s cirozom bez HCC-a imali lošiji funkcionalni stadij bolesti jetre u odnosu na bolesnike s cirozom i HCC-om. To je posljedica dizajna istraživanja koje je provedeno samo na hospitaliziranim bolesnicima. Naime, bolesnici s cirozom se hospitaliziraju u slučaju dekompenzacije ciroze, a u vrijeme provođenja ovog istraživanja većina bolesnika s cirozom i HCC-om je također hospitalizirana zbog dodatne dijagnostičke obrade, no oni nisu nužno bili dekompenzirani. Zbog toga je očekivano da su dekompenzirani bolesnici imali lošiji funkcionalni stadij bolesti jetre (niti jedan bolesnik nije bio u Child-Pugh stadiju A) u odnosu na bolesnike s HCC-om kojih je dio bio kompenziran (11 bolesnika).

Hemoglobin je također u našem ispitivanju bio značajno viši kod bolesnika s HCC i ALC, u odnosu na bolesnike s ALC ( $p < 0,001$ ), a medijani koncentracija hemoglobina u obje skupine su značajno niži u odnosu na zdrave ispitanike, što je također očekivano s obzirom na skupinu ispitanika, kako je prethodno objašnjeno. Koncentracija hemoglobina također je predložena kao nezavisni biljeg rizika za razvoj HCC-a kod bolesnika s cirozom, a ispitivanja upućuju da se koncentracija hemoglobina snižava s napredovanjem ciroze (135). U našem ispitivanju koncentracije hemoglobina su niže u rastućim stupnjevima ciroze, iako razlika nije statistički značajna ( $p = 0,054$ ).

Od biokemijskih parametara, aktivnosti ALT, GGT te koncentracije amonijaka i feritina bile su značajno više kod bolesnika s cirozom i HCC-om u odnosu na bolesnike s ALC bez HCC-a, dok je koncentracija bilirubina bila značajno niža kod bolesnika s HCC-om.

U prethodnim istraživanjima feritin se pokazao korisnim biljekom za ranu dijagnozu HCC-a kod bolesnika s hepatitisom B (136). Naše ispitivanje kod bolesnika s alkoholnom etiologijom HCC-a, također je potvrdilo da su kod bolesnika s ALC i HCC-om koncentracije feritina značajno više u odnosu na bolesnike s ALC-om. S obzirom na to da je feritin neinvazivni serumski biljeg koji se lako može odrediti rutinskim laboratorijskim ispitivanjem, njegovu serumsku vrijednost valjalo bi uzeti u obzir u praćenju bolesnika s cirozom.

Kronični unos alkohola nedvojbeno je štetan za zdravlje te dovodi do ciroze jetre, a potom i do razvoja HCC-a. Alkoholna bolest jetre jedan je od vodećih uzroka HCC-a, a zlouporaba alkohola povezana je s do 2 puta povećanim rizikom od razvoja HCC-a (40).

Etanol ne uzrokuje izravno upalu i oštećenje jetre, međutim, toksični nusprodukti katabolizma alkohola kao što su nakupljanje acetaldehida i slobodnih radikala mogu utjecati na oksidativni stres, apoptotičku smrt stanica i nekrozu. Generiranje reaktivnih vrsta kisika (ROS) rezultat je povećanog lučenja upalnih citokina uzrokovanog upalnim procesom. Oštećenje DNA inducirano ROS-om, genomska ranjivost hepatocita i supresija T-limfocita doprinose razvoju HCC-a (43-50, 137).

Također, katabolizam alkohola utječe na nekoliko koraka metabolizma lipida, što dovodi do steatoze jetre i inhibicije oksidacije masnih kiselina. Reverzibilnost ekspresije gena putem epigenetske promjene važan je biološki fenomen koji često igra ulogu u kancerogenezi. Epigenetski mehanizmi na koje utječe prekomjerna konzumacija alkohola dovode do promijenjene metilacije i acetilacije DNA (137).

Gore navedeno upućuje na kompleksne mehanizme kojima alkohol sudjeluje u kancerogenezi i očekivano je, što je i pokazano našim istraživanjem, da bi kombinacija više različitih biljega mogla imati veći značaj u dijagnozi HCC-a kod rizične skupine bolesnika.

Rana dijagnoza HCC-a je od ključnog značaja za smanjenje smrtnosti oboljelih. Posljednjih godina povećala se i mogućnost kurativnih terapijskih opcija koje je moguće ponuditi bolesnicima s ranim stadijem HCC-a (56, 114). S obzirom da više od 90% HCC-a nastaje kod bolesnika s cirozom jetre, postoje preporuke za uključivanje ove skupine bolesnika u programe pretraživanja kako bi se smanjila stopa mortaliteta i produžilo preživljenje bolesnika s HCC-om. Stupnjevanje tumora vrlo je važan korak u liječenju tumora jer osim prognostičke vrijednosti nudi i terapijske smjernice, odnosno identificira bolesnike kojima je moguće ponuditi terapijske opcije (56). U našem istraživanju AFP pokazao je statistički značajnu, ali

slabu diskriminacijsku sposobnost bolesnika s obzirom na stadij tumora. Svakako su potrebna daljnja istraživanja i ispitivanja novih potencijalnih biljega u cilju identifikacije bolesnika koji su kandidati za kurativne terapijske opcije, što bi uvelike imalo značaj na uspješnost liječenja i smanjenje stope mortaliteta.

Heterogenost genotipova bolesnika i raznolikost čimbenika rizika čine HCC složenom bolešću (138), ukazujući na poteškoće kod postavljanja dijagnoze i stupnjevanja HCC-a pomoću jednog biljega.

U usporedbi s prethodno provedenim ispitivanjima, ovo istraživanje je jedinstveno jer uključuje homogenu skupinu ispitanika s obzirom na etiologiju ciroze, međutim u obzir pri interpretaciji rezultata potrebno je uzeti i neka od njegovih značajnijih ograničenja.

Kao što je naprijed obrazloženo, u provedeno istraživanje su uključivani samo hospitalizirani bolesnici te je posljedično postojala razlika u stadijima ciroze između bolesnika sa i bez HCC-a, što treba uzeti u obzir kod interpretacije dobivenih rezultata i predstavlja ograničenje istraživanja.

U kontekstu prikazanih istraživanja drugih autora i različitih etiologija kronične bolesti jetre, rezultati prikazani u ovom radu upućuju na određene razlike u dijagnostičkim karakteristikama tumorskih biljega u dijagnostici HCC-a kod alkoholne etiologije ciroze u odnosu na virusnu etiologiju bolesti. Time se otvara prostor za daljnja istraživanja s ciljem validacije naših rezultata u drugim kohortama s većim brojem ispitanika, a u svrhu poboljšanja dijagnostike i kliničkih ishoda bolesnika s HCC-om.

## **6. ZAKLJUČCI**

Rezultati prikazanog istraživanja upućuju na sljedeće zaključke:

1. Medijani koncentracije AFP-a, %AFP-L3, PIVKAI, GALAD-a, GP3, SCCA1, CSTB i HGF-a su značajno viši u skupini bolesnika s alkoholnom cirozom s HCC-om, u odnosu na zdrave ispitanike, dok su medijani koncentracija %AFP-L3, GP3, SCCA1, CSTB i HGF-a značajno viši kod bolesnika s alkoholnom cirozom sa ili bez HCC-a u odnosu na raspon koncentracija kod zdravih ispitanika.
2. AFP i PIVKA II su uz GALAD jedini od testiranih biljega bili značajno povišeni u bolesnika s HCC-om i alkoholnom cirozom u odnosu na bolesnike koji su imali alkoholnu cirozu bez HCC-a.
3. PIVKAI je pojedinačno biljeg s najboljim mjerama dijagnostičke točnosti za HCC kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (AUC=0,903).
4. Kombinacija određivanja AFP i PIVKAI pokazala je značajno bolju dijagnostičku točnost (AUC=0,974) u odnosu na određivanje isključivo PIVKA II (p=0,031).
5. Koncentracija AFP –a pokazala je slabu, ali statistički značajnu diskriminativnu sposobnost za razlikovanje kurabilnog od inkurabilnog stadija HCC-, što je potrebno potvrditi daljnjim istraživanjima.
6. Serumske koncentracije GP3, CSTB i SCCA1 značajno se razlikuju kod bolesnika s obzirom na Child-Pugh stadij ciroze, a serumske koncentracije CSTB i SCCA1 pokazuju i dobru pozitivnu povezanost s funkcionalnim stadijem ciroze mjerenim MELD bodovnim sustavom, te mogu predstavljati potencijalne dodatne biljege funkcionalnog stadija bolesti jetre.

## **7. POPIS LITERATURE**

- 1 Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *The Development and Causes of Cancer*. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. Pristupljeno: 25.veljače 2021.
- 2 Malek NP, Schmidt S, Huber P, Manns MP, Greten TF. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111:101-6.
- 3 Tinkle CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools. *Biologics* 2012;6:207-19.
- 4 Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today>. Pristupljeno 14.03.2021.
- 5 Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino EC, da Silva RF, da Silva RC, et al. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(4):863-72.
- 6 Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>. Pristupljeno: 25.veljače 2021.
- 7 Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018. godine, Bilten 43, Zagreb, 2020:1-34.
- 8 Dhanasekaran R, Bandoh S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-879.
- 9 International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995; 22: 983–93.
- 10 International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. The International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*. 2009;49(2):658-64.
- 11 Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1999; 353:1253–7.



- 12 Di Bisceglie AM. Epidemiology and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol.* 2002;13(9 Pt 2):S169-71.
- 13 Sohal DP, Sun W. Hepatocellular carcinoma: prevention and therapy. *Curr Oncol Rep.* 2011;13(3):186–94.
- 14 Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology,* 2006;43:1303-10.
- 15 Leong TYM, Leong ASY. Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *HPB* 2005;7(6):438-57.
- 16 Singh AK, Kumar R, Pandey AK. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers. *Curr Chem Genom Transl Med.* 2018;12:9-26.
- 17 Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG. The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J Pediatr.* 1976; 88(3):434-8.
- 18 Kauppinen R, Mustajoki P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 1988; 57(1):117-20.
- 19 Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:16.
- 20 Tarao K, Nozaki A, Ikeda T, Sato A, Komatsu H, Komatsu T, et al. Real impact of liver cirrhosis on the development of hepatocellular carcinoma in various liver diseases-meta-analytic assessment. *Cancer Med.* 2019;8(3):1054-65.
- 21 Smith A, Baumgartner K, Bositis C. Cirrhosis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2019;100(12):759-70.
- 22 D'Amico G, Morabito A, D'Amico M, Pasta L, Malizia G, Rebora P, et al. Clinical states of cirrhosis and competing risks. *J Hepatol.* 2018;68(3):563-76.
- 23 Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al. Hepatic Venous Pressure Gradient Predicts Clinical Decompensation in Patients With Compensated Cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;133(2):481-88.

- 24 Merli M, Nicolini G, Angeloni S, Rinaldi V, De Santis A, Merkel C, et al. Incidence and natural history of small esophageal varices in cirrhotic patients. *J Hepatol.* 2003;38:266-72.
- 25 Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowsky S, Fleig WE, Seufferlein T, Dollinger MM. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liv Int.* 2012:1407-14.
- 26 D'Amico G, Pasta L, Morabito A, D'Amico M, Caltagirone M, Malizia G, et al. Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: a 25-year inception cohort study of 494 patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(10):1180-93.
- 27 Angeli P, Ginès P, Wong F, Bernardi M, Boyer TD, Gerbes A, et al. Diagnosis and management of acute kidney injury in patients with cirrhosis: revised consensus recommendations of the International Club of Ascites. *J Hepatol.* 2015;62(4):968-74.
- 28 Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2014;60:197-209.
- 29 Bajaj JS, O'Leary JG, Wong F, Reddy KR, Kamath PS. Bacterial infections in end-stage liver disease: current challenges and future directions. *Gut.* 2012;61(8):1219-25.
- 30 Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P. Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol.* 2014;60:1310-24.
- 31 Zhao C, Nguyen MH. Hepatocellular Carcinoma Screening and Surveillance: Practice Guidelines and Real-Life Practice. *J Clin Gastroenterol.* 2016;50(2):120-33.
- 32 Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S35-50.
- 33 Ioannou GN, Splan MF, Weiss NS, McDonald GB, Beretta L, Lee SP. Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5(8):938-45.

- 34 Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al; HALT-C Trial Group. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):138-48.
- 35 Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, et al; PAN FIBROSIS Group. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2003;38(3):257-65.
- 36 Ganne-Carrie N, Nahon P. Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease. *J Hepatol*. 2019;70:284-93.
- 37 Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5-S16.
- 38 Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014;63:844-55.
- 39 GBD 2016 Alcohol Collaborators. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2018;392(10152):1015-35.
- 40 Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatol* 2002;36(5):1206-13.
- 41 Taniai M. Alcohol and hepatocarcinogenesis. *Clin Mol Hepatol* 2020;26(4):736-41.
- 42 Matsushita H, Takai A. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *BMJ Open Gastroenterol* 2019;6:e000260.
- 43 Salaspuro M. Acetaldehyde: a cumulative carcinogen in humans. *Addiction* 2009;104(4):551-3.
- 44 Testino G, Leone S, Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: a review and a point of view. *World J Gastroenterol* 2014;20(43):15943-54.
- 45 Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health* 2007;30:38-47.

- 46 Salaspuro M. Acetaldehyde as a common denominator and cumulative carcinogen in digestive tract cancers. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:912-25.
- 47 Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2985-3011.
- 48 Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:2129-44.
- 49 Hagymasi K, Blazovics A, Lengyel G, Kocsis I, Feher J. Oxidative damage in alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:49-53.
- 50 Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterol* 2012;143:550-63.
- 51 Madrekar P, Szabo G. Signaling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* 2009;50:1258-66.
- 52 Edenvik P, Daidsdottir L, Oksanen A, Isaksson B, Hultcrantz R, Stal P. Application of hepatocellular carcinoma surveillance in a European setting. What can we learn from clinical practice? *Liver Int* 2015;35:1862-71.
- 53 Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16(10):589-604.
- 54 Singal AG, Pillai A, Tiro J. Early detection, curative treatments, and survival rates for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis: a meta analysis. *PLOS Med* 2014;1:e1001624.
- 55 Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases *Hepatology* 2018;68:723–50.
- 56 European Association For The Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018;69:182–236.

- 57 Omata M, Cheng AL, Kokudo N, Kudo M, Lee JM, Jia J, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int* 2017;11:317–70.
- 58 Harris PS, Hansen RM, Gray ME, Massoud OI, McGuire BM, Shoreibah MG. Hepatocellular carcinoma surveillance: An evidence-based approach. *World J Gastroenterol* 2019;25(13):1550-9.
- 59 Testino G. Alcoholic disease in hepato-gastroenterology – a point of view. *Hepatogastroenterology* 2008;55:371-7.
- 60 Wilson JMG, Jungner G, World Health Organization. The principles and practice of screening for disease (1968). Geneva, Switzerland. Dostupno na: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/4/07-050112BP.pdf>. Pristupljeno: 14.03.2021.
- 61 Dănilă M, Sporea I. Ultrasound screening for hepatocellular carcinoma in patients with advanced liver fibrosis. An overview. *Med Ultrason* 2014;16:139–44.
- 62 Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MA, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:37–47.
- 63 Singal AG, Conjeevaram HS, Volk ML, Fu S, Fontana RJ, Askari F, et al. Effectiveness of hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:793–9.
- 64 Simmons O, Fetzer DT, Yokoo T, Marrero JA, Yopp A, Kono Y, et al. Predictors of adequate ultrasound quality for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2017;45:169–77.
- 65 Della Corte C, Colombo M. Surveillance for hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2012;39:384–98.
- 66 Andersson KL, Salomon JA, Goldie SJ, Chung RT. Cost effectiveness of alternative surveillance strategies for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1418–24.

- 67 Pocha C, Dieperink E, McMaken KA, Knott A, Thuras P, Ho SB. Surveillance for hepatocellular cancer with ultrasonography vs. computed tomography - a randomised study. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:303–12.
- 68 Kim SY, An J, Lim YS, Han S, Lee JY, Byun JH, et al. MRI With Liver-Specific Contrast for Surveillance of Patients With Cirrhosis at High Risk of Hepatocellular Carcinoma. *JAMA Oncol* 2017;3:456–63.
- 69 Yin L, He N, Chen C, Zhang N, Lin Y, Xia Q. Identification of novel blood-based HCC-specific diagnostic biomarkers biomarkers for human hepatocellular carcinoma. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019;47(1):1908-16.
- 70 Toyoda H, Kumada T, Tada T, Sone Y, Kaneoka Y, Maeda A. Tumor Markers for Hepatocellular Carcinoma: Simple and Significant Predictors of Outcome in Patients with HCC. *Liver Cancer* 2015;4(2):126-36.
- 71 Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, et al. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*. 2016;3:41-53.
- 72 Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(8):1175-81.
- 73 Behne T, Copur MS. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Hepatol* 2012; Article ID 859076.
- 74 Rich N, Singal AG. Hepatocellular carcinoma tumour markers: Current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28(5):843-53.
- 75 Belanger I, Roy S, Allard D. New albumin gene 3' adjacent to the alpha 1-fetoprotein locus. *J Biol Chem* 1994;269:5481–4.
- 76 Chen DS, Sung JL, Sheu JC. Serum  $\alpha$ -fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1984;86 (6):1404-9.
- 77 Taketa K. Alpha-fetoprotein. *J Med Tech* 1989; 33:1380–4.
- 78 Wu JT. Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. *Ann. Clin Lab Sci* 1990;20(2):98-105.

- 79 Khien VV, Mao HV, Chinh TT, Ha PT, Bang MH, Lac BV, et al. Clinical evaluation of lentil lectin-reactive alpha-fetoprotein-L3 in histology-proven hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2001;16:105–11.
- 80 Oka H, Saito A, Ito K, Kumada T, Satomura S, Kasugai H, et al. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1378–83.
- 81 Yamashiki N, Seki T, Wakabayashi M, Nakagawa T, Imamura M, Tamai T, et al. Usefulness of *Lens culinaris* agglutinin A-reactive fraction of alpha-fetoprotein (AFP-L3) as a marker of distant metastasis from hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 1999;6:1229–32.
- 82 Weitz IC, Liebman HA. Des- $\gamma$ -carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. *Hepatology* 1993;18(4):990-7.
- 83 Abd El Gawad IA, Mossallam GI, Radwan NH, Elzawahry HM, Elhifnawy NM. Comparing prothrombin induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II) with the oncofetal proteins glypican-3, alpha fetoprotein and carcinoembryonic antigen in diagnosing hepatocellular carcinoma among Egyptian patients. *J Egypt Natl Canc Inst* 2014;26:79–85.
- 84 Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. *Hepatology* 2003;37(5):1114-21.
- 85 Gomaa AHO, Aboaraia G, Attia H, Elezawy H, Nafie E, ElBaz S. The diagnostic value of peripheral blood glypican-3 in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Med Sci* 2012;7:105-12.
- 86 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306(1):16-25.
- 87 Johnson PJ, Pirrie SJ, Cox TF, Berhane S, Teng M, Palmer D, et al. The detection of hepatocellular carcinoma using a prospectively developed and validated model based on serological biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:144–53.

- 88 Yang JD, Addissie BD, Mara KC, Harmsen WS, Dai J, Zhang N, et al. GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019;28(3):531-8.
- 89 Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977;40:1621-8.
- 90 Sun Y, Sheshadri N, Zong WX. SERPINB3 and B4: from biochemistry to biology. *Semin Cell Dev Biol* 2017;62:170-7.
- 91 Takeda A, Kajiya A, Iwasawa A, Nakamura Y, Hibino T. Aberrant expression of serpin squamous cell carcinoma antigen 2 in human tumor tissues and cell lines: evidence of protection from tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Biol Chem* 2002;383:1231-6.
- 92 Cannito S, Turato C, Paternostro C, Biasiolo A, Colombatto S, Cambieri I, et al. Hypoxia up-regulates SERPINB3 through HIF-2alpha in human liver cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:2206-21.
- 93 Turato C, Kent P, Sebastiani G, Cannito S, Morello E, Terrin L, et al. Serpinb3 is overexpressed in the liver in presence of iron overload. *J Investig Med* 2018;66:32-8.
- 94 Martini A, Pontisso P. Pro-oncogenic role of SerpinB3 in hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res* 2018;4:28.
- 95 Jevnikar Z, Kos J. CSTB (cystatin B (stefin B)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2009;13(6):406-8.
- 96 Lin YY, Chen ZW, Lin ZP, Lin LB, Yang XM, Xu LY, Xie Q. Tissue Levels of Stefin A and Stefin B in Hepatocellular Carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016;299(4):428-38.
- 97 Lee MJ, Yu GR, Park SH, Cho BH, Ahn JS, Park HJ, et al. Identification of cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(4):1080-9.
- 98 Donohue TM Jr, McVicker DL, Kharbanda KK, Chaisson ML, Zetterman RK. Ethanol Administration Alters the Proteolytic Activity of Hepatic Lysosomes. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18(3):536-41.



- 99 Wang H, Rao B, Lou J, Li J, Liu Z, Li A, et al. The Function of the HGF/c-Met Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:55.
- 100 Prystupa A, Kiciński P, Sak J, Boguszevska-Czubara A, Toruń-Jurkowska A, Załuska W. Proinflammatory Cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6) and Hepatocyte Growth Factor in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Gastroenterol Res Pract* 2015;2015:532615.
- 101 Yamagamim H, Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Saito T, et al. Serum concentrations of human hepatocyte growth factor is a useful indicator for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases. *Cancer* 2002;95(4):824-34.
- 102 Karademir S. Staging of hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res* 2018;4:58.
- 103 Subramaniam S, Kelley RK, Venook AP. A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems. *Chin Clin Oncol* (online) 2013;2(4). Dostupno na: <https://cco.amegroups.com/article/view/2528>. Pristupljeno: 24.veljače 2021.
- 104 Tsoaris A, Marlar CA. Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. [Updated 2020 May 17]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;2021 Jan-. Dostupna na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542308/>. Pristupljeno: 24.veljače 2021.
- 105 Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000;31(4):864-71.
- 106 Aiello F, Bajo M, Marti F, Gadano A, Musso CG. Model for End-stage Liver Disease (MELD) score and liver transplant: benefits and concerns. *AME Med J* 2017;2(11). Dostupno na: <https://amj.amegroups.com/article/view/4162>. Pristupljeno 25.veljače 2021
- 107 Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 198;56(4):918-28.
- 108 Wai Ling Khoo TS, Rehman A, Olynyk JK. Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. In: Tirnitz-Parker JEE, editor. *Hepatocellular Carcinoma*

[Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2019 Oct 24. Figure 1, BCLC staging system and treatment strategy. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549199/figure/Ch7-f0001/>. Pristupljeno: 24 veljače 2021.

109 Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334(11):693-9.

110 Berzigotti A, Reig M, Abraldes JG, Bosch J, Bruix J. Portal hypertension and the outcome of surgery for hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2015;61(2):526-36.

111 Tabrizian P, Jibara G, Shrager B, Schwartz M, Roayaie S. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg* 2015;261(5):947-55.

112 Lencioni R, Petruzzi P, Crocetti L. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Semin Intervent Radiol* 2013;30(1):3-11.

113 Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(26):4293-300.

114 Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, et al; IMbrave150 Investigators. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2020;382(20):1894-905.

115 Jang ES, Jeong SH, Kim JW, Choi YS, Leissner P, Brechot C. Diagnostic Performance of Alpha-Fetoprotein, Protein Induced by Vitamin K Absence, Osteopontin, Dickkopf-1 and Its Combinations for Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 2016;11(3): e0151069.

116 Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009;137(1):110-8.

- 117 Zhu R, Yang J, Xu L, Dai W, Wang F, Shen M, et al. Diagnostic Performance of Des- $\gamma$ -carboxy Prothrombin for Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2014;2014:529314.
- 118 Volk ML, Hernandez JC, Su GL, Lok AS. Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: A comparison of AFP, DCP, and AFP-L3. *Cancer Biomark* 2007;3(2):79–87.
- 119 Unić A, Đerek L, Stančin N, Serdar T, Šprajc N, Romić Ž. Comparison of two immunoassays for CA19-9, CEA and AFP tumor markers. *Biochem Med* 2010;1(20):82-9.
- 120 Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, et al. The Utility of Lens Culinaris Agglutinin-Reactive  $\alpha$ -Fetoprotein in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: Evaluation in a United States Referral Population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(3):394-402,
- 121 Yang SL, Fang X, Huang ZZ, Liu XJ, Xiong ZF, Liu P, et al. Can serum glypican-3 be a biomarker for effective diagnosis of hepatocellular carcinoma? A meta-analysis of the literature. *Dis Markers* 2014;2014:127831.
- 122 Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, Stewart S, Hudson M, Day C, et al. AFP, PIVKAI, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *BMC Cancer* 8 2008:200.
- 123 Giannelli G, Marinosci F, Sgarra C, Lupo L, Dentico P, Antonaci S. Clinical role of tissue and serum levels of SCCA antigen in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 116:579–83.
- 124 Soyemi OM, Otegbayo JA, Ola SO, Akere A, Soyemi T. Comparative diagnostic efficacy of serum squamous cell carcinoma antigen in hepatocellular carcinoma. *BMC Res Notes* 2012;5:403.
- 125 Best J, Bechmann LP, Sowa JP, Sydor S, Dechêne A, Pflanz K, et al. GALAD Score Detects Early Hepatocellular Carcinoma in an International Cohort of Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020;18(3):728-35.

- 126 Bertino G, Ardiri AM, Calvagno GS, Malaguarnera G, Interlandi D, Vacante M, et al. Carbohydrate 19.9 antigen serum levels in liver disease. *Biomed Res Int* 2013;2013:531640.
- 127 Singhal A, Lander E, Karachristos A, Daly E, Dowling P, Patel V, et al. Elevation of CA 125 and CA 19-9 in patients with end-stage liver disease. *Int J Biol Markers* 2012;27 (2): 147-51.
- 128 Bai DS, Zhang C, Chen P, Jin S-J, Jiang G-Q. The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2017;7:12870.
- 129 Abbasi A, Bhutto AR, Butt N, Munir SM. Corelation of serum alpha fetoprotein and tumor size in hepatocellular carcinoma. *J Pak Med Assoc* 2012;62:33–6.
- 130 Tang H, Tang X, Liu M, Li X. Targeting alpha-fetoprotein represses the proliferation of hepatoma cells via regulation of the cell cycle. *Clin Chim Acta* 2008;394:81–8.
- 131 Lu Y, Zhu M, Li W, Lin B, Dong X, Chen Y, et al. Alpha fetoprotein plays a critical role in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Mol Med* 2016;20(3):549-58.
- 132 Zakhary NI, Khodeer SM, Shafik HE, Abdel Malak CA. Impact of PIVKA-II in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Adv Res* 2013;4(6):539-46.
- 133 Ohhira M, Ohtake T, Saito H, Ikuta K, Tanaka K, Tanabe H, et al. Increase of serum des-gamma-carboxy prothrombin in alcoholic liver disease without hepatocellular carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23(4):67S-70S.
- 134 Yılmaz Y, Erdal E, Atabey N, Carr BI. Platelets, Microenvironment and Hepatocellular Carcinoma. *Biochem Anal Biochem* 2016;5:281.
- 135 Finkelmeier F, Bettinger D, Köberle V, Schultheiß M, Zeuzem S, Kronenberger B, et al. Single measurement of hemoglobin predicts outcome of HCC patients. *Med Oncol* 2014;31(1):806.
- 136 Bian Z, Hann HW, Ye Z, Yin C, Wang Y, Fang W, et al. Ferritin level prospectively predicts hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Oncol Lett* 2018;16:3499-508.

137 Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwagon O, Tan Y, et al. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World J Gastroenterol* 2019;25(19):2279-93.

138 Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. *World J Hepatol* 2015;7:1964–70.

## **8. POPIS KRATICA**

<b>AASLD</b>	Američko udruženje za proučavanje bolesti jetre
<b>ADH</b>	alkohol dehidrogenaza
<b>AFP</b>	alfa-fetoprotein
<b>AFP-L3</b>	lens culinaris aglutinin A-reaktivna frakcija alfa-fetoproteina
<b>AKI</b>	akutna ozljeda bubrega
<b>ALC</b>	alkoholna ciroza jetre
<b>ALDH</b>	aldehid dehidrogenaza
<b>ALP</b>	alkalna fosfataza
<b>ALT</b>	alanin aminotransferaza
<b>APASL</b>	Azijsko-pacifičko udruženje za proučavanje jetre
<b>AST</b>	aspartat aminotransferaza
<b>AUC</b>	površina ispod krivulje
<b>BCLC</b>	klasifikacija hepatocelularnoga karcinoma prema <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
<b>CA19-9</b>	karbohidratni antigen 19-9
<b>CEA</b>	karcinoembrionalni antigen
<b>CP</b>	Child-Pugh klasifikacija
<b>CRP</b>	C-reaktivni protein
<b>CSTB</b>	cistatin B (stefin B)
<b>CT</b>	kompjutorizirana tomografija
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>EASL</b>	Europsko udruženje za proučavanje jetre
<b>ELISA</b>	enzimimunoanaliza
<b>FNA</b>	tankoiglena aspiracijska biopsija
<b>Gab1</b>	GRB2-vezujući protein 1
<b>GALAD</b>	statistički model za procjenu vjerojatnosti hepatocelularnoga karcinoma u bolesnika s kroničnom bolešću jetre

<b>GGT</b>	gama-glutamil transferaza
<b>GP3</b>	glipikan-3
<b>Grb2</b>	protein 2 vezan za receptore faktora rasta
<b>GS</b>	glutamin sintetaza
<b>HBV</b>	virus hepatitisa B
<b>HCC</b>	hepatocelularni karcinom
<b>HCV</b>	virus hepatitisa C
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	hipoksijom inducirani faktor 2 alfa
<b>HIV</b>	virus humane imunodeficijencije
<b>HV</b>	zdravi ispitanici
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IgM</b>	imunoglobulin M
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	interleukin 1 $\alpha$
<b>IL-6</b>	interleukin 6
<b>INR</b>	međunarodno normalizirani omjer
<b>IWP</b>	međunarodna radna skupina
<b>LCA</b>	aglutinin - lektin lens culinaris
<b>LI-RADS</b>	sustav izvještavanja i podataka o slikovnim nalazima promjena na jetri
<b>LPS</b>	lipopolisaharidi
<b>MAPK</b>	proteinska kinaza aktivirana Ras-mitogenom
<b>MCV</b>	prosječni volumen eritrocita
<b>MELD</b>	model za završni stadij bolesti jetre
<b>MPV</b>	prosječni volumen trombocita
<b>MRI</b>	magnetska rezonancija
<b>mRNA</b>	glasnička ribonukleinska kiselina
<b>MSCT</b>	višeslojna kompjutorizirana tomografija
<b>MTHFR</b>	metil-tetrahidrofolat reduktaza



<b>NADH</b>	nikotinamid-adenin-dinukleotid
<b>NAFLD</b>	nealkoholna masna bolest jetre
<b>NASH</b>	nealkoholni steatohepatitis
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nuklearni faktor – $\kappa$ B
<b>PAGE-B</b>	model za procjenu rizika bolesnika s hepatitisom B za razvoj hepatocelularnoga karcinoma
<b>PD-L1</b>	ligand programirane smrti 1
<b>PEI</b>	perkutana injekcija etanola
<b>PI3k</b>	fosfatidilinozitol 3-kinaza
<b>PIVKAII</b>	des-gama-karboksi protrombin
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	fosfolipza $\gamma$
<b>PV</b>	protrombinsko vrijeme
<b>RFA</b>	radiofrekventna ablacija
<b>ROC</b>	krivulja operativnih karakteristika
<b>ROS</b>	reaktivni kisikovi spojevi
<b>SCCA1</b>	antigen karcinoma skvamoznih stanica 1
<b>SCCA2</b>	antigen karcinoma skvamoznih stanica 2
<b>SERPINS</b>	inhibitori serinskih proteaza
<b>STAT3</b>	pretvarač signala i aktivator transkripcije 3
<b>SZO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija
<b>TACE</b>	transarterijalna kemoembolizacija
<b>TIBC</b>	ukupni kapacitet vezanja željeza
<b>TIPS</b>	transjugularni intrahepatički šant
<b>TLR4</b>	receptor sličan Toll receptoru <i>Drosophila</i> vrste 4
<b>TMB</b>	tetrametilbenzidin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	čimbenik nekroze tumora alfa
<b>TNM</b>	klasifikacija tumora: T – broj tumora, N – zahvaćenost limfnih čvorova, M- prisutnost udaljenih metastaza

<b>TPK</b>	tirozin protein kinaza
<b>UIBC</b>	nezasićeni kapacitet vezanja željeza
<b>UZV</b>	ultrazvuk
<b>VEGF</b>	vaskularni endotelni čimbenik rasta

## **9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA**

Adriana Unić rođena je 21.05.1982. godine u Šibeniku gdje je pohađala osnovnu školu i Gimnaziju Antuna Vrančića. Godine 2000. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Tijekom studiranja dobila je CEPUS stipendiju za boravak u Odjelu za kliničku biokemiju Medicinskog fakulteta u Pragu. Diplomirala je 2006. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža, 2007. godine zaposlila se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položila je 2011. godine, stekavši zvanje specijalista medicinske biokemije. Od 2016. godine do danas radi u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Aktivni je član Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB), Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) i Hrvatskog centra za vrednovanje kvalitete u laboratorijskoj medicini (CROQALM).

Od 2009. do 2015. godine kao suradnik, sudjeluje u nastavi kolegija Bioanorganska kemija te Evaluacija instrumenata, postupaka i reagenasa na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Bila je pozvani predavač na 11 skupova. Autor je i koautor sedamnaest (17) znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u *Current Contents* i *Web of Science Core Collection*, jednog znanstvenog članka u ostalim časopisima, dvanaest (12) sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom, četiri (4) sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u knjigama sažetaka i šest (6) poglavlja u knjigama i obrazovnim materijalima.

## **Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja**

### **Poglavlja u knjizi**

1. Unić A. Dijalizat. U: Nikolac Gabaj N. ur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2019;p.180-8.
2. Unić A. Želučani sok. U: Nikolac Gabaj N. ur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2019;p.130-6.
3. Unić A. Prikazi slučajeva iz kliničke prakse. U: Sertić J. ur. Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga s primjerima iz kliničke prakse. Zagreb: Medicinska naklada; 2011;p. 629-809

### **Poglavlja u priručniku**

1. Gdje smo stigli sa standardizacijom TSH?. U: Nikolac Gabaj N. ur. Nove spoznaje o starim pretragama (Medicinska naklada, Zagreb, 2017).
2. Primjena Six Sigme u ocjeni metode. U: Ines Vukasović. Cjelovito upravljanje kvalitetom. Priručnik za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara (Medicinska naklada, Zagreb, 2015).
3. Računske pretrage acidobaznog statusa i elektrolita. U Šupak Smolčić ur. Matematika ili analitika? Može li se laboratorijski nalaz izračunati? Zagreb: Medicinska naklada (Medicinska naklada, Zagreb, 2021).

### **Radovi u CC časopisima**

1. Milevoj Kopčinović L, Brčić M, Vrtarić A, Unić A, Božović M, Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J. Long-term stability of clinically relevant chemistry analytes in pleural and peritoneal fluid. *Biochem Med (Zagreb)* 2020;30:020701.
2. Nikolac Gabaj N, Miler M, Unić A, Milevoj Kopčinović L, Vrtarić A, Culej J. Ascorbic acid in urine still compromises urinalysis results. *Ann Clin Biochem* 2020;57:64-68.15942

3. Nikolac Gabaj N, Unić A, Miler M, Pavičić T, Culej J, Bolanča I, Herman Mahečić D, Milevoj Kopčinović L, Vrtarić A. In sickness and in health: pivotal role of vitamin D. *Biochem Med (Zagreb)* 2020;30:020501.
4. Miler M, Nikolac Gabaj N, Culej J, Unić A, Vrtarić A, Milevoj Kopčinović L. Integrity of serum samples is changed by modified centrifugation conditions. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:1882-7.
5. Unić A, Đerek L, Duvnjak M, Patrlj L, Rakić M, Kujundžić M, Renjić V, Štoković N, Dinjar Kujundžić P, Jukić A, Grgurević I. Diagnostic specificity and sensitivity of PIVKAI, GP3, CSTB, SCCA1 and HGF for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Ann Clin Biochem* 2018;55:355–62.
6. Unić A, Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J, Lisac A, Horvat A, Vrkić N. Ascorbic acid – black hole of urine chemistry screening. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22390.
7. Đerek L, Servis D, Unić A. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 and Inflammatory Markers in Colorectal Cancer Surgery: A Prospective Cohort Study. *Chin Med J* 2017;130:2691-6.
8. Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? *Biochem Med* 2014; 24(2):235-47.
9. Serdar T, Derek L, Unic A, Marijancevic D, Markovic D, Primorac A, Petroveckii M. Occupational exposures in healthcare workers in University Hospital Dubrava--10 year follow-up study. *Cent Eur J Public Health* 2013; 21(3):150-4
10. Cernja M, Derek L, Unic A, Blazev M, Fistončić M, Kozaric-Kovacic D, Franić M, Romić Z. Oxidative stress markers in patients with post-traumatic stress disorder. *Coll Antropol* 2011;35(4):1155-60.
11. Romić Z, Derek L, Burek V, Unic A, Serdar T, Marijancevic D, Morovic Vergles J, Mitrovic J, Petroveckii M. Anty-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in HIV positive patients: *Rheumatol Int* 2011;31:1607-10.
12. Romić Z, Unic A, Derek L, Zivkovic M, Marijancevic D, Kes P, Pehar M. Anti citrullinated protein antibody in patients with end stage renal disease on hemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(8):959-62.

### **Radovi u ostalim časopisima**

1. Špoljarić B, Vince S, Grizelj J, Štibrić G, Samaržija M, Unić A, Romić Ž, Dobranić T, Gereš D. Progesterone concentration and conception rates after three different synchronization protocols in dairy cows. *Veterinarska stanica* 2017;4:397-408.17431
2. Unic A, Rogic, D, Rajsman G. Copeptin - Is There a Role for Another Cardiac Biomarker? *J Med Biochem* 2011;30(3): 224-9.
3. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Ceprnja M, Serdar T, Krhac M, Romic Z. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Med* 2011; 21:231-42.
4. Juricek J, Derek L, Unic A, Serdar T, Marijancevic D, Zivkovic M, Romic Z. Analytical evaluation of the clinical chemistry analyzer Olympus AU2700 plus. *Biochem Med* 2010;20(3):334-40.
5. Unic A, Derek L, Stancin N, Serdar T, Sprajc N, Romić Z: Comparison of two immunoassays for CA19-9, CEA and AFP tumor markers. *Biochem Med* 2010;20(1):82–9.
6. Romic Z, Unic A, Derek L , Pehar M. Biokemijski biljezi u dijagnostici akutnog koronarnog sindroma. *Acta Med Croatica* 2009;63:15-9.

### **Kongresni sažetci u CC časopisima**

1. Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J, Milevoj Kopčinović L, Unić A, Vrtarić A, Topić A. Is sample type associated with high hemolysis index?. *Clin Chim Acta* 2019;493:S673–S710.
2. Leniček-Krleža J, Unić A, Čelap I, Vlašić Tanasković J, Maradin M, Puc N, Aralica M, Grzunov A, Bokulić A, et al. CROQALM: Kvaliteta rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj – usporedba rezultata nacionalnog programa vanjske kontrole kvalitete u 2015. i 2017. godini. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(1):S165.
3. Čelap I, Unić A, Hećimović A, Leniček-Krleža J. Stability and homogeneity of whole bloodsamples in Croqalm hematology scheme. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:eA39.
4. Unić A, Nikolac N, Miler M, Horvat A, Vrkić N. Ascorbic acid interference on the performance of iChem Velocity and Combur10test®m urine chemistry strips. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:eA53.1643425.

5. Grgurevic I, Erjavec I, Grgurevic L, Prgomet S, Krizanac S, Heinzl R, Romić Z, Unić A, Petrovečki M, Kujundžić M, Vukicević S. 1037 BMP7 protein and BMP1-3 antibody prevent development and promote regression of CCl4 induced liver fibrosis in rats. *J Hepatol* 2011; 54.

### **Kongresni sažetci u ostalim časopisima**

1. Unić A. Analytical quality control based on risk management. *J Med Biochem* 2019;2(38):s213-4.17441
2. Marijančević D, Unić A. Utječe li nadzor Hrvatske akreditacijske agencije na učinkovitije upravljanje nesukladnostima u laboratoriju? 8. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Rijeka, Hrvatska, 2015. *Biochem Med* 2015;25(Suppl 1):S1-S158.

### **Kongresni sažetci u knjizi sažetaka**

1. Bokulić A, Čelap I, Unić A, Leniček-Krleža J. ACTH (in)stability. EQALM SYMPOSIUM 2018; (book of abstracts). Zagreb; 18. - 19. listopada 2018.
2. Leniček-Krleža J, Čelap I, Vlašić Tanasković J, Grzunov A, Unić A, Puc N, et al. CROQALM: Osvrt i procjena kvalitete rada medicinsko biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj na temelju rezultata nacionalnog programa vanjske kontrole kvalitete u 2015. 4. Simpozij u organizaciji Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) i tvrtke Abbott Laboratories LOKUS (knjiga sažetaka). Tuheljske toplice; 2016.
3. Žura Žaja I, Vince S, Samaržija M, Sluganović A, Strelec S, DeIvechio I, Šuran J, Unić A, Đuričić D, Milinković-Tur S. Antioxidative capacity and intensity of lipid peroxidation in the reproductive system of boars. Proceedings of the 20th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) and the 13th Conference of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) 2016;153.



4. Culej J, Milevoj Kopčinović L, Unić A. Comparison of two six sigma values using two different allowable total error criteria. 15th EFLM Continuing Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Zagreb, Croatia (book of abstracts) 2015;P58.
5. Leniček-Krleža J, Čelap I, Vlašić Tanasković J, Grzunov A, Unić A, Puc N, et al. Performance of Medical Laboratories in Croatia: Results of National Program of External Quality Control – CROQALM. 23rd Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation; (book of abstracts). Sarajevo, Bosnia and Herzegovina; 7. - 9. listopada 2015.
6. Marijancevic D, Unic A, Fucek M, Rogic D. Is there any improvement in glycolysis inhibition due to new additive mixture? 3rd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Porto, Portugal, 2015. CCLM. 2015;53(4):eA1-eA91.
7. Unic A, Grgurevic I, Derek L, Marijancevic D, Serdar T, Romić Z. AFP-L3-screening marker for a hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. 20th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Milano, Italy, 2013. Biochim Clin. 2013;37(3):07-083.
8. Cepnja M, Serdar T, Hodak N, Živković M, Marijancevic D, Romić Z. Unsuitable specimens in clinical practice: before and after an educational lecture. 2nd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Zagreb, Croatia, 2013. Biochem Med. 2013;23(1):A1–A55.
9. Unic A, Derek L, Marijancevic D, Serdar T, Romić Z. Analytical performance of tumor markers on UniCel DxI 600 using Sigma metrics. 2nd European Joint Congress of EFCC and UEMS: Laboratory Medicine at the Clinical Interface, Dubrovnik, Croatia, 2012. Biochem Med 2012;22(3):A21-A204.
10. Đerek L, Unić A, Juriček J, Marijančević D, Romić Ž. Koncentracije humanog fetuina-A kod bolesnika na hemodijalizi. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska, 2009. Biochem Med. 2009;19,Suppl1:S148-S149.
11. Romić Ž, Unić A, Đerek L, Živković M, Marijančević D. ProtutijelaLL na ciklički citrulinski protein i reumatoidni faktor u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska, 2009. Biochem Med. 2009;19,Suppl1:S148-S149.

12. Zadro R, Pulanić D, Unić A, Boban D, Marković-Glamočak M, Sučić M, Ries S, Gjadrov-Kuvedžić K, Nemet D, Serventi- Seiwerth R. Incidence of FLT3 Internal Tandem Duplication in Acute Promyelocytic Leukemia. Abstract Book 7th seminar New Trends in the Treatment of Acute Leukemia; Dubrovnik, 2004.

### **Pozvana predavanja na skupovima**

1. Unić A. Računske pretrage acidobaznog statusa i elektrolita. Tečaj trajne edukacije Hrvatske komore medicinskih biokemičara: Matematika ili analitika? Može li se laboratorijski nalaz izračunati?; Zagreb, siječanj 2021.
2. Unić A. Analytical quality control based on risk management. 5th Belgrade Symposium for Balkan Region; Beograd, Srbija, 11.-12. travnja 2019.
3. Unić A. Mehanizam djelovanja i fiziološka uloga vitamina D. 30. simpozij Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Vitamin D u zdravlju i bolesti; Zagreb, 21. rujna 2019.
4. Unić A. Gdje smo stigli sa standardizacijom TSH? Tečaj trajne edukacije Hrvatske komore medicinskih biokemičara: Nove spoznaje o starim pretragama; Zagreb, 6. svibnja 2017.
5. Analitička kvaliteta temeljena na procjeni rizika, 8. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu s međunarodnim sudjelovanjem; Rijeka, rujan 2015.
6. Primjena Six Sigme u ocjeni metode, Tečaj trajne edukacije Hrvatske komore medicinskih biokemičara: Cjelovito upravljanje kvalitetom; Zagreb, ožujak 2015
7. Serološki testovi, simpozij Tumori jetre - multidisciplinarni pristup; Zagreb, prosinac 2014.
8. Serum biomarkers in hepatocellular carcinoma, 2. kongres hepatobilijarne i pankreatične kirurgije; Split, listopad 2014
9. Biljezi upale u praćenju treninga i sportskih ozljeda, 24. simpozij Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Uloga laboratorijske medicine u sportu; Zagreb; svibanj 2013
10. CLSI smjernice za verifikaciju laboratorijskih metoda, e-seminar HDMBLM; veljača 2013

11. Copeptin - Is There a Role for Another Cardiac Biomarker? EFCC Symposium for Balkan Region; Beograd, Srbija; lipanj 2011.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## EVALUACIJA SERUMSKIH BILJEGA U DIJAGNOZI HEPATOCELULARNOGA KARCINOMA KOD CIROZE JETRE ALKOHOLNE ETIOLOGIJE

ADRIANA UNIĆ

Hepatoceleularni karcinom (HCC) je epitelna zloćudna novotvorina s prisutnom hepatocelularnom diferencijacijom i najčešća je primarna zloćudna novotvorina jetre. Ciroza jetre je najznačajni rizični čimbenik za razvoj HCC-a. Dosadašnja istraživanja pokazuju da će 1/3 bolesnika s cirozom razviti i HCC, a oko 90% bolesnika s HCC-om ima i cirozu jetre. S obzirom da je ciroza ključan rizični čimbenik u nastanku HCC-a, a etiologija ciroze ima ulogu u mehanizmima kancerogeneze, temeljni cilj ovog istraživanja bio je ispitati individualnu i kombiniranu dijagnostičku točnost alfa-fetoproteina (AFP), lens culinaris aglutinin A-reaktivne frakcije alfa-fetoproteina (AFP-L3), des-gama-karboksi protrombina (PIVKaII), glikoproteina 3 (GP3), antigena pločastih stanica karcinoma-1 (SCCA1), cistatina B (CSTB) i hepatocitnog faktora rasta (HGF) kao potencijalnih tumorskih biljega za dijagnozu HCC-a kod bolesnika s alkoholnom cirozom jetre. Radiološke slikovne metode i/ili tkivno uzorkovanje (biopsija tumora) korišteni su kao "zlatni dijagnostički standard" u dijagnozi HCC-a.

Ispitivanje je provedeno kod 31 bolesnika s alkoholnom cirozom bez HCC-a i 32 bolesnika s alkoholnom cirozom sa HCC-om. U ispitivanje je uključeno i 20 zdravih ispitanika kako bi se verificirale granične vrijednosti za one biljege za koje ne postoji specifikacija proizvođača. Prvo uzorkovanje periferne venske krvi provedeno je u stanju gladovanja, a drugo nakon urađenih slikovnih pretraga i prije bilo kakvih terapijskih intervencija. Biopsija tumora je rađena nakon uzorkovanja, ukoliko je bila indicirana.

Koncentracije PIVKaII i AFP-a, bile su značajno više u bolesnika s alkoholnom cirozom i HCC-om nego u bolesnika s alkoholnom cirozom bez HCC-a, dok su pojedinačne dijagnostičke izvedbe ostalih ispitivanih biljega bile nedostatne.

"Najbolja" kombinacija tumorskih biljega uključuje AFP i PIVKaII s dijagnostičkom točnošću od 97,4%. Također, koncentracija AFP-a pokazala je diskriminativnu sposobnost za razlikovanje kurabilnog od inkurabilnog stadija bolesti (s obzrom na veličinu i broj tumora), što je potrebno potvrditi daljnjim istraživanjima.

Među ostalim provedenim testovima, koncentracija hemoglobina, broj trombocita, aktivnosti alanin-aminotransferaze (ALT) i gama-glutamil-transferaze (GGT) te koncentracije amonijaka i feritina bile su značajno više u bolesnika s HCC-om i alkoholnom cirozom u odnosu na bolesnike s alkoholnom cirozom bez HCC-a.

Dodatno, serumske koncentracije CSTB i SCCA1 pokazale su dobru pozitivnu povezanost s funkcionalnim stadijem ciroze.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da AFP i PIVKaII imaju najbolju diskriminativnu sposobnost za dijagnozu HCC-a u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre, uz dodatno poboljšanje dijagnostičke točnosti ukoliko se koriste u kombinaciji. U usporedbi s ranijim istraživanjima, može se pretpostaviti da bi dijagnostička izvedba tumorskih biljega mogla ovisiti o etiologiji bolesti jetre u podlozi HCC-a, za što su potrebna daljnja istraživanja.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 101 stranice, 11 slika, 15 tablica i 138 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: hepatocelularni karcinom, alkohol, ciroza jetre, PIVKaII, cistatin B

Mentori: izv. prof. dr. sc. Ivica Grgurević  
izv. prof. dr. sc. Marija Grdić Rajković

Povjerenstvo: prof. dr. sc. Dunja Rogić  
prof. dr. sc. József Petrik  
doc. dr. sc. Mirjana Kalauz

Rad je prihvaćen: 20. travnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### EVALUATION OF SERUM MARKERS IN DIAGNOSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN LIVER CIRRHOSIS OF ALCOHOL ETIOLOGY ADRIANA UNIĆ

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of primary liver cancer. Approximately 90 % of HCC cases are diagnosed in patients with pre-existing cirrhotic liver. Since cirrhosis is a key risk factor in the development of HCC, and the etiology of cirrhosis plays a role in the mechanisms of carcinogenesis, the basic goal of this study was to examine the individual and combined diagnostic accuracy of alpha-fetoprotein (AFP), lens culinaris agglutinin (LCA) reactive fraction of AFP (AFP-L3), protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKAI), glypican-3 (GP3), squamous cell carcinoma antigen 1 (SCCA1), cystatin B (CSTB) and hepatocyte growth factor (HGF) as potential tumor markers for the diagnosis of HCC in patients with alcoholic liver cirrhosis (ALC) using imaging techniques and/or tumor biopsy as reference standard in the diagnosis of HCC. The study was performed in 31 patients with ALC and 32 patients with ALC and HCC. 20 healthy subjects were also included in order to verify cut-off values. The first sampling of peripheral venous blood was performed in the fasting state, and the second after imaging tests and before any therapeutic interventions. Tumor biopsy was performed after second sampling, if it was indicated.

Serum concentrations of AFP and PIVKAI were significantly higher in patients with ALC and HCC than in patients with ALC, while individual diagnostic performance of the other markers was inadequate.

The “best” combination of tumor markers includes AFP and PIVKAI with diagnostic accuracy of 97,4%.

The concentration of AFP showed a discriminant ability to distinguish curable from incurable stage of the disease (given the size and number of tumors), which needs to be confirmed by further research.

Among other performed tests, hemoglobin concentration, platelet count, alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities, and ammonia and ferritin concentrations were significantly higher in patients with HCC and ALC than in patients with ALC.

Additionally, serum concentrations of CSTB and SCCA1 showed a good positive correlation with the functional stage of cirrhosis.

The results of this study suggest that AFP and PIVKAI have the best discriminant ability to diagnose HCC in patients with alcoholic liver cirrhosis, with a further improvement in diagnostic accuracy when used in combination. Compared to previous studies, it can be assumed that the diagnostic performance of tumor markers could depend on the etiology of HCC-based liver disease and further research is needed to confirm this.

This thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

This thesis includes: 101 pages, 11 figures, 15 tables and 138 references. Original is in Croatian language.

Keywords: hepatocellular carcinoma, alcohol, liver cirrhosis, PIVKAI, cystatin B

Supervisors: Associate Professor Ivica Grgurević, Ph.D.  
Associate Professor Marija Grdić Rajković, Ph.D.

Reviewers: prof. dr. sc. Dunja Rogić  
prof. dr. sc. József Petrik  
doc. dr. sc. Mirjana Kalauz

Accepted: 20<sup>th</sup> April 2022.