

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

MAJDA JARKOVIČ

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA ALFAFETOPROTEINA
PRI HEPATOCELULARNEM KARCINOMU RAZLIČNE
ETIOLOGIJE**

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2009

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

MAJDA JARKOVIČ

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA ALFAFETOPROTEINA
PRI HEPATOCELULARNEM KARCINOMU RAZLIČNE
ETIOLOGIJE**

**CLINICAL ROLE OF ALFAFETOPROTEIN
DETERMINATION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA
WITH DIFFERENT ETIOLOGY**

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Gastroenterološki interni kliniki pod mentorstvom prof.dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika. Somentor pri izdelavi naloge je bil dr. Rado Janša, dr.med.

Zahvaljujem se prof.dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., višjemu svetniku in dr. Radu Janši, dr.med, za strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge ter vsem zaposlenim v laboratoriju na Infekcijski kliniki, za pomoč pri meritvah.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem, partnerju in vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku predloženega diplomskega dela in mi bili v oporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof.dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	iii
ABSTRACT	iv
KAZALO SLIK	v
KAZALO PREGLEDNIC	vi
SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC	vii
1. UVOD	1
1.1. JETRA.....	1
1.2. HCC	4
1.2.1. INCIDENCA	4
1.2.2. ETIOLOGIJA	5
1.2.3. KLINIČNA SLIKA	6
1.2.4. DIAGNOSTIKA.....	6
1.2.5. ZDRAVLJENJE	8
1.2.6. MOLEKULARNE OSNOVE RAZVOJA HCC.....	10
1.3. TUMORSKI OZNAČEVALCI V KLINIČNI ONKOLOGIJI.....	12
1.3.1. SENZITIVNOST IN SPECIFIČNOST TUMORSKIH OZNAČEVALCEV	13
1.3.2. RAZDELITEV TUMORSKIH OZNAČEVALCEV	15
1.3.3. ALFAFETOPROTEIN KOT TUMORSKI OZNAČEVALEC	16
1.3.4. DOLOČANJE TUMORSKIH OZNAČEVALCEV V SERUMU.....	18
2. NAMEN DELA	19
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1. OPIS ZBIRANJA PREISKOVANCEV	20
3.2. OPIS VZORCEV SERUMA.....	20
3.3. OPIS KEMILUMINISCENČNE IMUNOLOŠKE SENDVIČ METODE.....	20
3.3.1. PRINCIP METODE	20
3.3.2. MATERIALI	22
3.3.3. PRIPRAVA REAGENTOV IN VZORCEV	22
3.3.4. KALIBRACIJA ANALIZATORJA	23
3.3.5. POTEK ANALIZE	23
3.3.6. SPECIFIČNE KARAKTERISTIKE NAPRAVE LIASON.....	25
4. REZULTATI	27
4.1. OVREDNOTENJE CELOTNE SKUPINE.....	27
4.2. DELITEV BOLNIKOV V SKUPINE IN STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	33
4.2.1. PRVA DELITEV	34
4.2.2. DELITEV GLEDE NA STADIJ TUMORJA	35
4.2.3. DELITEV GLEDE NA KONCENTRACIJO AFP	37
4.2.4. DELITEV GLEDE NA OCENO FUNKCIJSKE SPOSOBNOSTI JETER	41
5. RAZPRAVA	45
6. ZAKLJUČEK	49
7. LITERATURA	50

POVZETEK

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najbolj pogost primarni jetrni rak. Povzroča veliko stopnjo smrtnosti in slabo prognozo, predvsem zaradi oteženega zgodnjega odkrivanja in omejenih možnosti zdravljenja. Ker se vlogo določanja alfafetoproteina (AFP) kot tumorskega označevalca pri bolnikih s HCC raziskuje že mnogo let, razprava o tem pa je še vedno odprta, smo se odločili proučiti klinično uporabnost AFP kot tumorskega označevalca v skupini 48 bolnikov HCC, zbranih v Gastroenterološki interni kliniki v Ljubljani. V času postavitve diagnoze so z ultrazvokom izmerili velikosti tumorjev (upoštevali smo največjega prisotnega). Po standardnih laboratorijskih postopkih so bile narejene hematološke in biokemične analize ter testi za oceno funkcijske sposobnosti jeter (AST, ALT, γ -GT, albumin). V zbranih serumih smo z kemiluminiscenčno imunološko sendvič metodo izmerili koncentracijo AFP. Dobljene podatke smo razdelili glede stadija tumorja, koncentracijo AFP in Child-Pughovo klasifikacijo. S pomočjo statističnih metod smo iz dobljenih podatkov prišli do sledečih zaključkov:

Tumorski označevalec AFP ima za detekcijo HCC dobro občutljivost (83,3%) in specifičnost (72%). 50% bolnikov je imelo diagnostično vrednost ($> 400\mu\text{g/l}$) AFP. Rečemo lahko, da ima tumorski označevalec AFP v naši skupini HCC bolnikov dobro diagnostično uporabnost.

Koncentracije AFP niso signifikantno višje v prisotnosti metastaz niti pri bolnikih z večjimi in številnejšimi tumorji. Pri bolnikih s premerom tumorja $> 5\text{cm}$, ima 29% koncentracijo AFP znotraj referenčne vrednosti ter 38% bolnikov ima diagnostično vrednost. Sklepamo, da normalne vrednosti AFP ob diagnozi ne pomenijo, da tumor ni prisoten, kakor tudi, če je prisoten ne pomenijo, da je velikost majhna. Prisotne so šibke korelacije koncentracije AFP z velikostjo tumorja, zato lahko pričakujemo slabšo prognozo pri bolnikih s koncentracijo AFP med 8 in $400\mu\text{g/l}$ ($R= 0,578$) ter pri tistih s cirozo Child B ($R= 0,447$) in C ($R= 0,397$). Večje koncentracije AFP nakazujejo na večjo okvaro hepatocitov pri bolnikih z vrednostjo $\text{AFP} > 8\mu\text{g/l}$ ter pri tistih s cirozo Child C, kar sklepamo iz izračunanih šibkih korelacij med [AFP] in [γ -GT].

Za boljšo prezentativnost zaključkov, bi bilo smiselno ponoviti študijo na večjem številu bolnikov, ter preveriti klinično uporabnost AFP v kombinaciji s komplementarnim tumorskim markerjem, ki je povišan pri HCC bolnikih (npr. AFP L3). Pričakovali bi lahko še večjo občutljivost in specifičnost.

ABSTRACT

The most common primary liver tumor is HCC. It is the cause of high rate of death and poor prognosis, especially because the diagnosing is difficult and treatment options are limited. Many years have been spent in discussing the role of AFP determination in the management of HCC but debate is still open. That is why we decided to study clinical role of AFP in the management of HCC in the group of 48 HCC patients, collected in Gastroenterologic internal clinic in Ljubljana. When the diagnosis was made, tumor size was determined with ultrasound (the largest diameter of tumor was measured) and biochemical, hematological tests and liver function tests (AST, ALT, γ -GT, albumin) were performed by standard laboratory procedures. We determined AFP levels by chemiluminescence immunoassay technique. We stratified collected data with respect to tumor stage, AFP level and Child-Pugh score. We evaluated collected data with statistical methods and made following conclusions:

AFP is good marker for determination in the management of HCC, with sensitivity of 83,3% and specificity of 72% . 50% of patients had diagnostic level ($> 400\mu\text{g/l}$) of AFP. In our group of people tumor marker AFP has good diagnostic role.

AFP levels are not significantly higher in patients with bigger and more tumors. In patients with tumor above 5cm have 29% and 38% values within the normal or diagnostic range. Normal results in the determination of the marker does not mean HCC is not there, but does not even mean that if it is there, it is at least in its early stage. Weak correlation between AFP level and tumor size is present, so we expected worse prognosis in patients with AFP level between 8 and $400\mu\text{g/l}$ ($R= 0,578$) and in those with Child B ($R= 0,447$) and C ($R= 0,397$) cirrhosis. Higher AFP level is suggesting major damage of the hepatocytes in patients with AFP level $> 8\mu\text{g/l}$ and in those with Child C cirrhosis, because weak correlation between AFP and γ -GT levels are present.

For better conclusion power, a bigger group of HCC patient should be studied and clinical usefulness of AFP determination in the management of HCC should be checked, in combination with complementary tumor marker (AFP-L3). Better sensitivity and specificity can be expected, from single determination of AFP.

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz zgradbe jetrnega režnjiča.....	1
Slika 2: Prikaz nastanka HCC.....	5
Slika 3: Prerez jetrnega tkiva in s puščicami označen HCC	7
Slika 4: Pomen občutljivosti in specifičnosti.....	14
Slika 5: Kemiluminiscenčna imunološka sendvič metoda	21
Slika 6: Avtomatski analizator LIAISON.....	24
Slika 7: ROC krivulja za [AFP] in VELIKOST TUMORJA.....	32
Slika 8: Prikaz korelacije med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA.....	39
Slika 9: Prikaz korelacije med [AFP] in [CA 19-9].....	39
Slika 10: Prikaz korelacije med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA.....	40
Slika 11: Prikaz korelacije med [AFP] in [γGT]	40
Slika 12: Prikaz odvisnosti med [AFP] in [γGT]	40
Slika 13: Prikaz korelacije med [AFP] in [ALB].....	43
Slika 14: Prikaz odvisnosti med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA.....	44
Slika 15: Prikaz odvisnosti med [AFP] in [ERIT]	44
Slika 16: Prikaz korelacije med [AFP] in [γ-GT]	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Kriteriji za Child-Pughovo klasifikacijo	6
Preglednica II: Pomen stopenj A, B, C	7
Preglednica III: Uporaba tumorskih označevalcev v onkologiji	12
Preglednica IV: Izračunavanje senzitivnosti in specifičnosti	14
Preglednica V: Rezultati za ocenitev ponovljivosti znotraj in med analiznimi postopki	25
Preglednica VI: Izmerjene vrednosti AFP v serumu pacientov po različnih rečitvah, osnovna koncentracija AFP = 614 (kU/l)	25
Preglednica VII: Rezultati meritev različnih koncentracij AFP	26
Preglednica VIII: Vsi dobljeni podatki za zbrane bolnike	28
Preglednica IX: Prikaz vseh skupin	33
Preglednica X: Rezultati multiple regresijske analize pri prvi delitvi	34
Preglednica XI: Povprečne vrednosti pomembnih parametrov pri drugi delitvi	35
Preglednica XII: Izračun signifikantnosti glede na koncentracijo AFP za drugo delitev	35
Preglednica XIII: Rezultati Post Hoc testov za drugo delitev	36
Preglednica XIV: Izračun signifikantnosti glede na VELIKOST TUMORJA za drugo delitev	36
Preglednica XV: Rezultati multiple regresijske analize za skupino z METASTAZAMI	36
Preglednica XVI: Rezultati multiple regresijske analize za skupino BREZ METASTAZ IN BREZ MULTIFOKALNIH	37
Preglednica XVII: Povprečne vrednosti pomembnih parametrov pri delitvi glede na koncentracijo AFP	37
Preglednica XVIII: Izračun signifikantnosti glede na VELIKOST TUMORJA pri delitvi glede na koncentracijo AFP	38
Preglednica XIX: Rezultati Post Hoc Testov pri delitvi glede na koncentracijo AFP	38
Preglednica XX: Rezultati multiple regresijske analize za skupino [AFP] $\leq 8\mu\text{g/l}$	39
Preglednica XXI: Rezultati multiple regresijske analize za skupino [AFP] med 8 in $400\mu\text{g/l}$	39
Preglednica XXII: Rezultati multiple regresijske analize za skupino [AFP] $\geq 400\mu\text{g/l}$	40
Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti pomembnih parametrov pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter	41
Preglednica XXIV: Izračun signifikantnosti glede na koncentracijo AFP pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter	41
Preglednica XXV: Rezultati Post Hoc testov pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter	42
Preglednica XXVI: Izračun signifikantnosti glede na VELIKOST TUMORJA pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter	42
Preglednica XXVII: Rezultati multiple regresijske analize pri skupini CHILD A	43
Preglednica XXVIII: Rezultati multiple regresijske analize pri skupini CHILD B	43
Preglednica XXIX: Rezultati multiple regresijske analize pri skupini CHILD C	44
Preglednica XXX: Pomembne korelacije pri posameznih skupinah	47

SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

HCC - hepatocelularni karcinom

AFP - alfafetoprotein

γ -GT - gama glutamil transferaza

AST - aspartat-amino transferaza

ALT - alanin-amino transferaza

ALB - albumin

CA 19-9 - karcinomski antigen 19-9

HB - hemoglobin

TROMB - trombociti

ERIT - eritrociti

Sig. - signifikanca

p - verjetnost

df - prostostne stopnje

1. UVOD

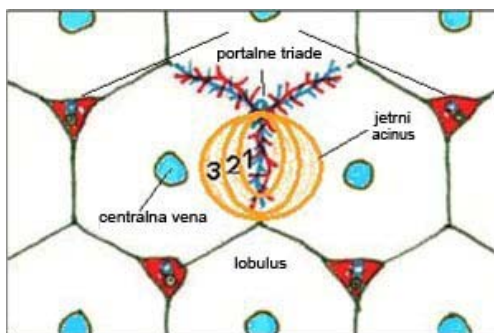
1.1. JETRA

ANATOMIJA JETER

Jetra so največja žleza v telesu. Pri odraslem človeku tehtajo 1500 g. Ležijo v desnem zgornjem kvadrantu trebušne votline. Duplikatura peritoneja na parietalni površini jih razdeli v desni in levi reženj. Jetra imajo dvojno oskrbo s krvjo: **funkcionalno - v. portae**, kri iz črevesa, vranice in pankreasa, priskrbi 75% kisika in **nutritivno - a. hepatica propria**; priskrbi ostalih 25% kisika. S stališča vaskularizacije so jetra vedno v nekoliko hipoksičnem okolju.

Portalna vena in hepatična arterija vstopata v jetra skozi jetrno lino (porto hepatis) na visceralni površini jeter. Po vstopu v jetra se razdelita v veji za desni in levi jetrni reženj. Žilam se pridružita levi in desni hepatični žolčni vod, ki se nato v porti hepatis združita v skupni hepatični vod. Tri glavne hepatične vene (desna, srednja, leva) se vlivajo v spodnjo veno kavo.

Funkcionalno anatomsko razdelimo jetra na 8 segmentov. Vsak ima ustrezen portalni pedikel, ki ga sestavljajo segmentna veja hepatične arterije, portalne vene in žolčni vod. Osnovna morfološka enota jeter je **jetrni lobulus = režnjič** (Slika 1). Predstavlja šesterkotni del parenhima, ki obdaja centralno veno. Na obrobju režnjiča ležijo portalna polja (= triade), sestavljene iz končnih vej portalne vene in hepatične arterije ter žolčnega voda. V lobulusu so hepatociti radialno razporejeni okrog v centralis, med njimi so sinusoidi. Kri iz portalne vene in hepatične arterije teče skozi sinusoidne v zbiralne centralne vene. Glede na to, da na lobularnem nivoju teče kri v smeri od portalne triade proti centralni veni, lahko opisujemo patološke spremembe kot centrolobularne ali kot periportalne. To olajša mikroskopsko diagnostiko, ne ustreza pa funkciji posameznih delov.



Slika 1: Prikaz zgradbe jetrnega režnjiča

Tako raje opisujemo funkcionalno mikrocirkulacijsko enoto jeter kot – **jetrni acinus** (imenovanje uvedel Rappaport): acinus razdelimo na tri funkcionalne cone, glede na oksigenacijo: *cona una* (hepatociti okoli triade), *cona tri* (parenhimske celice okrog centralne vene) in *cona dve* (celice med obema conama). Hepatociti v 1. coni so prvi preskrbljeni z oksigenirano krvjo ter so tako odpornejši proti strupom in nekrozi ter se prvi regenerirajo. Celice v ostalih dveh conah pa so bolj občutljive in se ne regenerirajo v takem obsegu.

90% jetrnega parenhima tvorijo jetrne celice – **hepatociti**. Imajo poliploidna jedra, včasih tudi po dve na celico. Citoplazma je bogata z mitohondriji, endoplazmatskim retikulumom, lizosomi, peroksisomi in glikogenskimi zrcni. Vsaka parenhimska jetrna celica ima **3 površine**: **sinusoidno** (neposredni stik s krvjo), **kanalikularno** (med dvema sosednjima hepatocitoma omejuje žolčni kanalikul) in **lateralno** (tesno medsebojno stikanje hepatocitov). Prek teh površin potekajo medsebojne informacije.

Steno **sinusoida** sestavlja porozna mreža endotelijskih in **Kupfferjevih celic** (fagocitirajo bakterije in endotoksine). Med sinusoidi in hepatociti se nahaja **Dissejev prostor** (intersticij), v katerem so **Itove celice** (mesto shranjevanja vitamina A, krčijo in širijo se pod vplivom vazoaktivnih snovi in uravnavajo sinusoidni krvni pretok). Sinusoidna stena nima bazalne membrane (kot druge kapilare v telesu) in je fenestrirana, kar omogoči neposreden stik hepatocita s krvjo in prosto prepuščajo beljakovine zaradi česar tu ni onkotskega tlaka. To je zelo pomembno pri mehanizmu nastanka ascitesa, saj lahko tekočina prosto prehaja iz žil v intersticij (ogromne količine tekočine), zato imajo jetra dobro uravnan limfni sistem. V Dissejev prostor se tako zliva vsebina sinusoidov; med sinusoidi nastanejo tudi žolčne kapilare (omejene s tesnimi stiki) – na njihovih stenah pa so aktivni transportni sistemi za prenos bilirubina in žolčnih kislin iz hepatocitov.

Ekskrecijski jetrni sistem se začne z žolčnimi kanalikuli (med hepatociti), ti se združujejo v žolčne duktule, več duktulov pa v interlobularne žolčne vode (v portalnih poljih). Ti vodi po velikosti naraščajo in se v porti združijo v ekstrahepatična izvodila (1).

FUNKCIJE JETER

Metabolizem

A) Ogljikovih hidratov

Pomembna vloga jeter je vzdrževanje stalne koncentracije glukoze v krvi – glukostaza, ki se doseže z dvema procesoma: v kolikor je v krvi previsoka koncentracija glukoze, se odvečna shranjuje v jetrih v obliki glikogena. Ob pomanjkanju glukoze v krvi pa pride do glikogenolize (encimska razgradnja glikogena do glukoze) in glukoneogeneze (sinteza glukoze iz piruvata, laktata, glicerola, aminokislin, galaktoze, fruktoze...).

B) Lipidov

V jetrih poteka β -oksidacija maščobnih kislin, sinteza holesterola, fosfolipidov, ketonskih teles ter lipogeneza (sinteza maščob iz proteinov in ogljikovih hidratov). Večina holesterola se pretvori v žolčne soli, preostali del pa se vgradi v lipoproteine. Jetra razgrajujejo hilomikronske ostanke in s holesterolom zasičen HDL ter sintetizirajo lipoproteine VLDL, ki se pretvarjajo naprej v LDL, IDL in HDL. V jetrih poteka tudi pretvorba ogljikovih hidratov in proteinov v maščobe, iz odvečnega Ac-CoA pa poteče sinteza ketonskih teles.

C) Aminokislin in proteinov

V jetrih poteka interkonverzija in oksidativna deaminacija aminokislin. Pri deaminaciji nastaja NH_3 (amoniak), ki stopi v cikel uree ter se tako izloči iz telesa. Z interkonverzijo se sintetizirajo proteini, kreatin, glutation, tvorijo se tudi neesencialne aminokisliline, ki jih v telesu primanjkuje. Jetra tvorijo vse plazemske proteine (albumini, globulini, faktorji koagulacije, inhibitorji koagulacije in fibrinolize, proteini akutne faze, transferin,...) razen nekaterih gama-globulinov. Jetra tvorijo tudi fibrinogen (faktor I), faktorje V, VII, IX, X, XII in protrombin (faktor II) ter imajo tako pomembno vlogo pri koagulaciji. Za te procese je pomemben vitamin K, ki se tudi shranjuje v jetrih (izvor so črevesne bakterije).

D) Hormonov

V jetrih poteka proteolitična razgradnja inzulina in glukagona. Inaktivirajo in izločajo tudi tiroidne in steroidne hormone. Okvara jeter tako povzroči prekomerno koncentracijo in aktivnost teh hormonov.

Izločevanje

Jetra izločajo žolč, ki omogoča prebavo in absorbcijo maščob ter izločanje žolčnih kislin, odvečnega holesterola, maščobnih kislin, bilirubina, lecitina in elektrolitov. Z žolčem se izločajo tudi inaktivirani hormoni in telesu tuje spojine.

Akumulacija

V jetrih se shranjujejo vitamini A, D, K, B12, shranjena količina pa zadostuje za več mesecev. V jetrih v obliki feritina, je shranjena največja količina železa v telesu (z izjemo hemoglobina). Odvečno železo v krvni cirkulaciji se tako veže na apoferritin.

Inaktivacija tujih snovi

V jetrih se inaktivira biološka aktivnost zdravil, strupov in prehranskih aditivov. Vodotopne snovi se izločajo z urinom in žolčem, lipidotopne pa se najprej pretvorijo v vodotopne. Potekajo reakcije 1.faze (biotransformacija z monooksigenazami in drugimi encimi na agranuliranih endoplazmatskih retikulumih hepatocitov) deaktivirajo reaktivne snovi z oksidoredukcijo, hidroksilacijo, deaminacijo, ali sulfoksidacijo; reakcije 2.faze (konjugacija lipidotopnih snovi v vodotopne) pa vežejo glukuronsko kislino, acetat, sulfat, glicin, itd.

Hematopoeza

Jetra v otroštvu ali pri določenih patoloških pojavih delujejo tudi kot krvotvorni organ – gre za ekstramedularno hematopoezo (ne poteka v kostnem mozgu) (1).

1.2.HCC

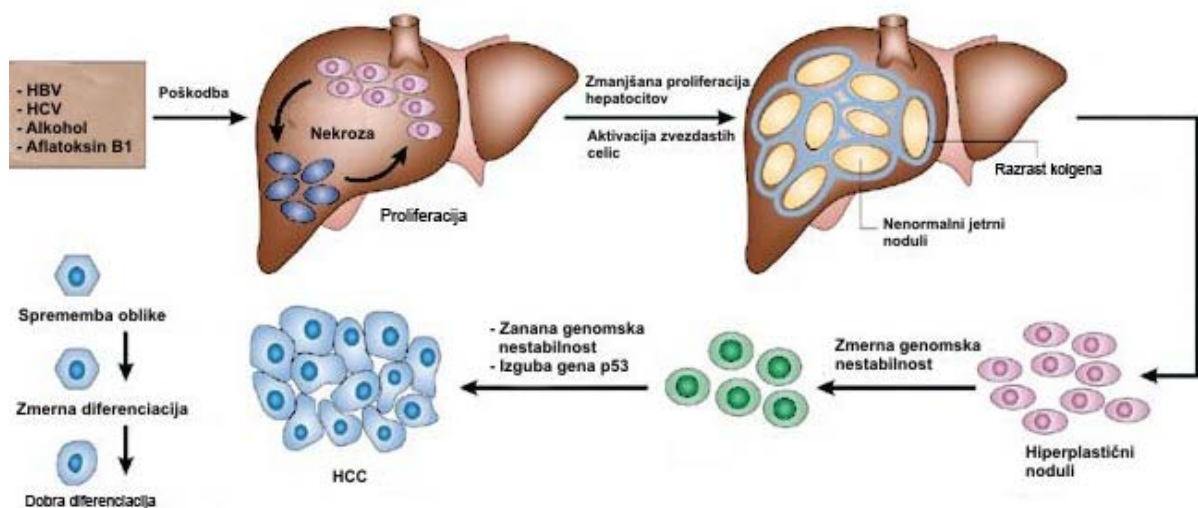
1.2.1. INCIDENCA

HCC je počasi rastoč tumor z dolgo latentno dobo (do 30 let). Navadno je diagnosticiran v že napredovalem stadiju, ko je težko ozdravljiv. Ti pacienti imajo slabo prognozo in zelo omejene možnosti za zdravljenje. HCC je najpogostejši primarni tumor jeter in sicer predstavlja 75 – 90% primarnih malignih neoplazem (2). V svetu je jetrni rak tretji vodilni razlog za smrt, katere vzrok je rak. Je takoj za rakom pljuč in želodca (3). Zaradi jetrnega raka letno umre približno 600,000 ljudi, od tega približno 54% na Kitajskem. Razporeditev je močno povezana s prevalenco okužbe z virusom hepatitisa B. Incidenca je najvišja v podsaharski Afriki, med 58 in 104 primeri na 100.000 prebivalcev, na Japonskem in v preostalih delih Azije je nekoliko nižja – 17,3 na 100.000 prebivalcev. Incidenca je najnižja na zahodni polobli, v ZDA in Veliki Britaniji – od 1,8 do 4 na 100.000 prebivalcev. Načeloma je rak jeternih celic bolezen odrasle dobe, pojavlja pa se tudi pri otrokih. V področjih z visoko incidenco postanejo prenašalci že majhni otroci po vertikalnem prenosu

virusa z matere na plod, kar 200 krat poveča tveganje za nastanek HCC v odrasli dobi. Bolniki so v teh področjih v povprečju stari od 20 do 50 let, v področjih z nižjo incidenco bolniki zboleajo po 60 letu (4). Iz nepojasnjenih razlogov se HCC pogosteje pojavlja pri moških kot pri ženskah in sicer se giblje v razmerju od 4 : 1 do 8 : 1.

1.2.2. ETIOLOGIJA

HCC se najpogosteje pojavi v predhodno **cirotičnih** in posthepatično okvarjenih jetrih (v 60-90%). Vsako leto se pri 1-6% bolnikov z jetrno cirozo razvije HCC (5). Vzrok okvare jeter, ki ji sledi pojav raka, je na zahodni polobli najpogosteje prekomerno **uživanje alkohola**, sledijo kronične okužbe z **virusi hepatitisa (HBV in HCV)** in **metabolne bolezni jeter** (hemokromatoza, Wilsonova bolezen, tirozinemija, bolezen shranjevanja glikogena ter pomanjkanje alfa-1 antitripsina) (Slika 2) (6). V krajih z visoko incidenco HCC je najpomembnejši etiološki dejavnik virusni hepatitis, v podsaharski Afriki morda še **aflatoksini**, ki izvirajo iz kontaminacije žitaric z glivo *Aspergillus flavus*; molekularni princip delovanja aflatoksinov je mutacija proteina, ki mutira tudi ob okužbi s HBV. Tako v imenovanih področjih okužba s HBV, aflatoksini in genetska dispozicija sinergistično povečajo tveganje za nastanek HCC (4). V svetovnem merilu je okužba z virusi hepatitisa najpomembnejši vzrok HCC. Večje tveganje je prisotno predvsem pri moških bolnikih, starejših od 50 let, okuženih tako s HCV kot HBV in ki dodatno zaužijejo več kot 80g alkohola na dan (7, 8).



Slika 2: Prikaz nastanka HCC

1.2.3. **KLINIČNA SLIKA**

Klinične manifestacije HCC so neznačilne, v področjih z nižjo incidenco jih večinoma zakrivajo tiste, povezane z osnovno boleznijo jeter, cirozo ali hepatitisom. Najpogostejši znak HCC je povečanje jeter ali tvorba v jetrih. Pogosti so nespecifični simptomi in znaki kot so povišana telesna temperatura neznanega vzroka, bolečine v trebuhu, šibkost, utrudljivost, izguba telesne teže in občutek tiščanja ali prisotnosti mase v zgornjem delu trebuha. Pri bolnikih z jetrno cirozo lahko nastopi naglo poslabšanje jetrne funkcije, postopno naraščanje AFP in alkalne fosfataze (AF). Lahko so prisotne patološke vrednosti jetrnih testov in pojavijo se znaki jetrne odpovedi: progresivna zlatenica, ascites, podaljšano delovanje zdravil in patološki testi koagulacije. V krajih z visoko incidenco je klinična slika ob odkritju hujša; pogostejše so krvavitve in ruptura jeter (4).

1.2.4. **DIAGNOSTIKA**

Z upoštevanjem anamneze dobijo podatke o dejavnikih tveganja in simptomih. Diagnozo postavijo s pomočjo kliničnega pregleda, laboratorijskih preiskav, tumorskih označevalcev, virusne serologije in slikovnih preiskav. Med krvnimi izvidi ni za HCC prav nič značilnega. Izvidi biokemičnih testov pokažejo spremembe jetrne ciroze. Stopnjo jeterne ciroze določijo po Child-Pughovi klasifikaciji (Preglednici I, II). Pri bolniku z jetrno cirozo vzbudi sum na HCC nesorazmeren in nepojasnen dvig alkalne fosfataze, gama-GT in laktatne dehidrogenaze. Pri majhnih tumorjih je bilirubin običajno normalen. V krvi določajo tumorska označevalca AFP, CA 19-9, ki sta pri HCC običajno povišana (1, 4).

Preglenica I: Kriteriji za Child-Pughovo klasifikacijo

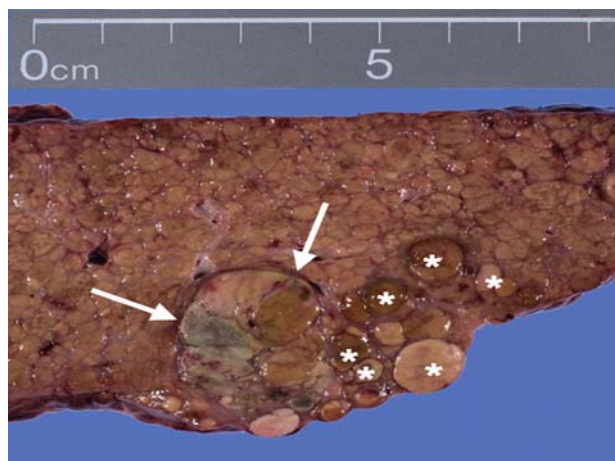
Znak	Točke		
	1	2	3
Ascites	odsoten	blag	močan
Bilirubin, mg/dL	≤ 2	2-3	>3
Albumin, g/dL	>3.5	2.8-3.5	<2.8
INR	<1.8	1.8-2.3	>2.3
Encefalopatija	None	stopnja 1-2	stopnja 3-4

Legenda: **Child A: 5 – 6 točk; Child B: 7 – 9 točk; Child C: 10 – 15 točk**

Preglednica II: Pomen stopenj A, B, C

Stopnja	Točke	Enoletno preživetje pacienta (%)	Dvoletno preživetje pacienta (%)
A: dobro kompenzirana bolezen	5-6	100	85
B: delno kompenzirana bolezen	7-9	80	60
C: dekompenzirana bolezen	10-15	45	35

Prva slikovna preiskava je **ultrazvočni pregled (UZ)**, ki je široko dostopna neinvazivna metoda ter najcenejša izmed vseh radioloških tehnik. Slabosti UZ so slaba reproducibilnost, subjektivnost preiskave, morebitna omejenost kvalitete posnetkov zaradi bolnikove debelosti, interpozicije reber in prisotnosti zraka v desnem zgornjem kvadrantu. Lahko pokaže solitaren proces, večje število manjših lezij ali difuzni ifiltrativni proces. Z UZ lahko odkrijejo tudi spremembe s premerom 1cm, občutljivost pri njihovem odkrivanju pa zmanjša makronodularna ciroza. Občutljivost UZ pri odkrivanju HCC pri bolnikih z jetrno cirozo je 78%, specifičnost pa 50 – 70% (4).



Slika 3: Prerez jetrnega tkiva in s puščicami označen HCC

Nadaljnji diagnostični postopki potekajo stopenjsko in jih izvajajo racionalno, do tiste stopnje, ko se odločijo ali se lahko bolniku omogoči zdravljenje ali ne. Za razliko od drugih malignih tumorjev, zdravljenja HCC ne omejuje samo stadij tumorja, temveč tudi stopnja jetrne okvare. Pri bolniku z napredovalo jetrno boleznijo tumor ugotovijo z UZ pregledom in potrdijo z določitvijo koncentracije tumorskega označevalca – AFP in diagnostika se tu zaključuje. Kadar je za zdravljenje potrebna natančnejša opredelitev tumorja, izvedejo CT

(računalniška tomografija), NMR (nuklearna magnetna resonanca) in v nekaterih primerih tudi radioizotopne preiskave (1). Določijo lahko lego, število in odnos tumorja do žilnega in biliarnega sistema, operabilnost. Tehnika **CT z lipiodolom** (oljno kontrastno sredstvo in mikroembolizacijsko sredstvo) se je primarno razvila za odkrivanje in zdravljenje HCC (9, 10). Izvede se tako, da se pacientu selektivno preko arterije hepaticke aplicira 10mL lipiodola, čez 10 do 14 dni pa se napravi CT. Kontrast takrat selektivno zaostane v tumorju in hčerinskih nodusih. Pomanjkljivost metode je slabše kopičenje lipiodola v slabo vaskulariziranem, nekrotičnem in fibrotičnem tkivu (4). **Magnetna resonanca** ima kljub dokazom o superiornosti nad CT še vedno omejeno klinično uporabo (11, 12). Vzrok za omejeno uporabo je visoka cena, nedostopnost in dolžina preiskave. Kot primarna metoda se uporablja pri bolnikih, ki so alergični na neionska kontrastna sredstva in v primeru maščobne infiltracije jeter. Prekrvavljenost tumorja pogledajo z **angiografijo**. Običajno se izvaja z vstavitvijo katetra v hepaticno arterijo, v kateter se vbrizga kontrastno sredstvo. CT, UZ ali MR tehnika prikaže arterijski in venski sistem. Za maligne tumorje je značilna povečana arterijska prekrvavljenost. Normalne jetrne celice dobivajo kri pretežno iz portalne vene (4).

Pri dokončni postavitvi diagnoze HCC ima dostikrat največjo vlogo histološki pregled tkiva tumorja. Velikokrat je patologu težko ločiti med HCC-jem in katero koli drugo obliko jetrnih tumorjev. Ločitev med njimi je pomembna zaradi različnega načina zdravljenja. Odvzem histološkega materiala se lahko izvede s slepo, ultrazvočno ali laparoskopsko vodeno **biopsijo** iz tumorja. Glavna rizična faktorja pri izvedbi sta: krvavitve iz tumorja, ki je navadno dobro prekrvavljen; majhni zasevki tumorja se lahko z iglo prenesejo drugam po jetrnem tkivu (13). Kadar je pri bolniku z jetrno cirozo viden tumor v jetrih in je koncentracija AFP večja od 500µg/l, biopsija ni potrebna (1).

1.2.5. ZDRAVLJENJE

Pri zdravljenju izbiramo med transplantacijo jeter in operacijo ali neoperativnimi načini. Neoperativni načini so: perkutana alkoholna sklerotizacija, radiofrekvenčna ablacija in kemoembolizacija. V primeru nezdravljenja je povprečno preživetje po postavitvi diagnoze manj kot 6 mesecev. Za kirurško ali nekirurško zdravljenje se odločajo na osnovi izvidov zamejitve tumorske bolezni, stanja jetrnega tkiva in splošnega stanja bolnika (1).

Operativno zdravljenje

Edina ozdravitvena operacija je **presaditev jeter**. Le-ta je primerna pri bolnikih z manjšimi tumorji (HCC manjši od 5cm ali trije noduli, katerih velikost je manjša od 3cm) (14, 15, 16). Pozitivna stran transplantacije je, da ozdravi maligno obolenje in cirozo. Negativna stran pa, da 15% bolnikov umre v prvem letu, imunosupresivno zdravljenje ima številne stranske učinke, ozdravi cirozo vendar ne tudi vzroke zanjo (virusni hepatitis). Petletno preživetje bolnikov s HCC po transplantaciji je 38%, kar je nizko v primerjavi s transplancijo jeter zaradi nemaligne bolezni, ki je 67% (17). Pri tumorjih, večjih od 5cm ali z več kot 3 nodusi, je zaradi visokega odstotka recidiva izbor zdravljenja resekcija.

Resekcijsko zdravljenje mora upoštevati principe rasti in širjenja HCC in stanje jetrnega tkiva. Odločitev glede kirurškega zdravljenja in obsega resekcije v zadnjih priporočilih japonskih avtorjev temelji na prisotnosti in možnosti kontroliranja ascitesa in na vrednostih bilirubina in klirensa zelenila indocianina v 15 minutah. Pri ascitesu, ki je refraktern na zdravljenje, kirurški poseg na jetrih zaradi tumorja ne pride v poštev. Tudi pri bilirubinu nad 2,0 mg/dl naj jeter ne bi resecirali (18). Glede na obseg resekcije razlikujemo segmentektomije, lobektomije (operativni poseg, pri katerem odstranimo reženj organa) in trisegmentektomije. Pooperativni potek bolezni je pri bolnikih s HCC lahko težak in obolevnost po teh posegih je med 35 in 45%, smrtnost pa okoli 5%. Vzrok za to je največkrat v jetrni insuficienci, kot posledici osnovne jetrne bolezni ali v preveliki resekciji jeter pri bolnikih z malignomi v jetrih, ki niso prizadeta s kronično boleznijo. Do jetrne insuficience po operaciji pride tudi zaradi masivne krvavitve med posegom, zaradi hipoksične okvare jeter med operacijo zaradi zamaščenih jeter ali pri zlatenici (19). Po svetovnih statistikah pride pri bolnikih po operativnem zdravljenju raka jeter do recidiva znotraj treh let v 80-85%, zato je potrebno sledenje na tri mesece.

Neoperativno zdravljenje

Transkateterska arterijska **kemoembolizacija** predvsem neresektabilnih in neoperabilnih HCC je ena od metod zdravljenja, ki z uporabo novih kemoterapevtikov (najučinkovitejša kemoterapevtika sta 5-fluorouracil in doksorubicin) obeta boljše rezultate takega zdravljenja (20, 21). To zdravljenje se priporoča kadar ni prisotne vaskularne invazije, kadar je prisoten en tumor oz je več tumorjev, ki so manjši od 5 cm (22). Kadar se odločijo za neoperativno zdravljenje, pride v poštev kemoembolizacija in/ali takoimenovano intersticijsko zdravljenje z **alkoholno sklerotizacijo tumorja**. Alkoholne injekcije s tankimi iglami v tumor, povzročijo dehidracijo tumorskih celic in s tem denaturacijo

celičnih proteinov. Najbolj primerni so bolniki, ki imajo manj kot 3 tumorje. Ti naj bi bili dobro definirani, manjši od 3cm in obdani s kapsulo. Ne sme biti prisotne zlatenice ali ascitesa. Alkoholizacija HCC v cirotičnih jetrih je dala dobre rezultate s 5-letnim preživetjem pri stadiju A po Child-Pughu do 50% in stadiju B po Child-Pughu do 12%. Namen kemoembolizacije je zmanjšati ne operabilni tumor do operabilnosti in hkrati podaljšati čas preživetja oz. izboljšati kakovost življenja (23). Med intersticijsko zdravljenje štejejo tudi ablacijo tumorja s pomočjo sonde z radiofrekvenčnimi valovi s kriosondo ali z laserjem. **Radiofrekvenčno ablacijo** lahko delajo tudi perkutano pod ultrazvočno vodeno kontrolo. Lokalno usmerjena toplota povzroči koagulativno nekrozo v tkivu. Ta metoda postaja alternativa tradicionalni alkoholni sklerotizaciji, ker dosega boljše lokalno kontrolo tumorja (24). Krioterapijo in radiofrekvenčno ablacijo lahko izvajajo tudi po laparoskopski poti, torej tudi po operativni metodi (25).

Prihaja novo obdobje v terapiji HCC, ki temelji na tarčni molekularni terapiji. HCC se ne odziva dobro na sistemsko kemoterapijo in v napredovalem stadiju do sedaj ni bilo učinkovite terapije. **Multikinazni inhibitor – sorafenib** kaže vzpodbudne rezultate za zdravljenje. Inhibira kinaze, ki so pomembne za progresijo in angiogenezo tumorja, vključno z Raf/MEK/ERK signalno potjo (26, 27, 28). Rezultati faze III dvojno slepe klinične študije, kontrolirane s placebom kažejo, da se je bolnikom z napredovalim HCC, ki so jemali sorafenib, preživetje podaljšalo za 44% v primerjavi s placebo skupino. Signifikantno je podaljšano tudi obdobje napredovanja bolezni pri bolnikih, ki so jemali sorafenib v primerjavi s placebom. Sorafenib je pred kratkim EMEA odobrila (Evropska agencija za zdravila) za zdravljenje napredovalega HCC (29).

1.2.6. MOLEKULARNE OSNOVE RAZVOJA HCC

Celična transformacija se začne s kroničnim propadom hepatocitov, ki stimulira kronično regeneracijo celic. Ta proces vodi do jetrne ciroze (normalno jetrno tkivo se nadomesti z vezivnim). Celična hiperproliferacija s časoma povzroči povečano možnost za kopičenje genetskih sprememb, kot so aktivacija onkogenov in deaktivacija tumor supresorskih genov.

HBV se vgradi v gostiteljsko DNA in povzroči povečano izražanje HBx (hepatitis B virusni protein x), ki je promotor celične transformacije preko večih mehanizmov:

- transaktivirajo gostiteljeve gene vključene v celično rast kot je IGF-2 (inzulinu podobni rastni faktor 2) in njegov receptor IGRF 1;

- blokirajo tumor supresorske proteine (p53, Rb – retinoblastom tumor zavirajoči protein) (30);

- direktno interagirajo z gostiteljevimi proteini, vključno s kinazami, ki regulirajo apoptozo, npr. PI3K (fosfatidilinozitol-3 kinaza).

HCV se ne vgradi v gostiteljevo DNA, vendar ima indirekten vpliv na kronično poškodbo celic in cirozo. Direktno pa virusni strukturni in nestrukturni proteini vplivajo na celično apoptozo, regulirano z p53 genom (31).

Znanih je nekaj molekularnih kaskadnih poti, ki se ponavljajo in so bolj aktivirane pri razvoju in napredovanju HCC. V 90% je aktivirana **ERK** (od ekstracelularnega signala odvisna kinaza) pot, ki uravnava celično delitev. V tej kaskadi sta pomembna dva molekularna prenašalca in sicer majhen GTP protein – Ras in serin/treonin kinaza – **Raf** (32). Z blokiranjem ERK poti se doseže antikarcenogeno delovanje. Inhibira se celična proliferacija in indukcija, poveča celična apoptoza, zmanjša tumorogeneza (33). Več kot 50% HCC tumorjev ima povečano izražanje β -katenina. β -katenin je intracelularni efektor v **Wnt/ β -katenin** signalni poti, ki stimulira tumorsko proliferacijo in angiogenezo (34). **PI3K** (fosfatidilinozitol-3 kinaza) kinazna pot je odgovorna za blokado celične apoptoze in poveča celično preživetje (35). PI3K pot je delno regulirana z aktivacijo PTEN (produkt tumor supresorskega gena, ki je mutiran pri večih rakavih obolenjih, vključno z HCC). Delecija PTEN gena ali reducirana ekspresija je bila odkrita pri polovici HCC bolnikov (35). Zmanjšana koncentracija PTEN je neodvisni prognostični faktor za slabše preživetje in je signifikantno koreliran z napredovalo stopnjo bolezni (36). Velikokrat je pri HCC motena regulacija EGRF (epidermalni rastni faktor). Stimulacija receptorja za EGRF povzroči aktivacijo obeh Raf/MEK/ERK in PI3K poti (37).

Sposobnost jeter za regeneracijo je odvisna od učinkovite angiogeneze – razvoj novih prekrvavitev, ki vključuje aktivacijo, proliferacijo in migracijo endotelijskih celic ter pericitov (v stromi nahajajoče podobne gladkomišičnim celicam, ki obkrožajo kapilare). Za normalno angiogenezo je potrebno ravnotežje med stimulativnimi in inhibitornimi dejavniki. Angiogenetsko ravnotežje se pri HCC poruši, ko tumorske celice, tumor-infiltracijske vnetne celice in normalne jerne celice začnejo izločati povečane količine angiogenetskih faktorjev: VEGF – vaskularni endotelijski rastni faktor, EGF – epidermalni rastni faktor, PDGF – tumorski rastni faktor, interlevkine (IL - 4 in 8) (38, 39). Povečana angiogeneza je pogoj za tumorsko rast, invazivnost in metastaziranje.

1.3. TUMORSKI OZNAČEVALCI V KLINIČNI ONKOLOGIJI

Rezultat maligne transformacije je maligna celica, iz katere nastane ob vsaki nadaljnji delitvi nova maligna celica. V tem procesu pridobijo maligno spremenjene celice nekaj novih lastnosti, po katerih se razlikujejo od nemalignih celic istega izvora. Nastale spremembe se odražajo v spremenjeni morfolologiji, fiziologiji in rasti (obnašanju) celice. Snovi, ki jih pri tem spremljamo, imenujemo tumorski označevalci.

Ustaljena definicija tumorskih označevalcev v klinični onkologiji zajema predvsem snovi, ki so produkt malignih celic ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic in jih lahko določimo v telesnih tekočinah. Tumorski označevalci so lahko bodisi novosintetizirane snovi, kakršnih v zdravem organizmu ne najdemo, bodisi snovi, ki so v normalnem organizmu prisotne v veliko nižjih koncentracijah. Doslej znani označevalci so manj primerni za odkrivanje primarnih malignih bolezni, zato jih le redko uporabljamo kot presejalno metodo. Poleg tega vseh označevalcev ne uporabljamo z istim namenom; nekateri so primernejši za spremljanje dinamike bolezni, drugi pa za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni. Tumorski označevalci nam lahko služijo kot napovedni dejavniki. Na splošno velja, da so izredno visoke koncentracije tumorskih označevalcev slab prognostični pokazatelj (40).

UPORABA TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

Teoretično so možnosti za uporabo tumorskih označevalcev v onkologiji številne, njihova dejanska uporabnost pa je odvisna od senzitivnosti in specifičnosti označevalca ter od zanesljivosti drugih metod, ki so na voljo za doseg istega cilja (Preglednica III).

Preglednica III: Uporaba tumorskih označevalcev v onkologiji

ZA SPREMLJANJE BOLEZNI	ZA ZDRAVLJENJE
Določanje v telesnih tekočinah <ul style="list-style-type: none">· spremljanje odgovora na zdravljenje· zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni· spremljanje razširjenosti bolezni· razlikovanje med malignimi in benignimi boleznimi· presejalna metoda pri nekaterih vrstah raka Imunoscintigrafija in limfoscintigrafija Imunohistokemija <ul style="list-style-type: none">· za diagnozo· za napoved poteka bolezni· za napoved odgovora na zdravljenje	Direktna citotoksičnost specifičnih monoklonskih protiteles (MoAb) <ul style="list-style-type: none">· vezava komplementa na specifična MoAb· vezava citotoksičnih celic na specifične označevalce - receptorje Vezava zdravil na specifična MoAb Vezava toksinov na specifična MoAb Vezava radioaktivnih izotopov na specifična MoAb

1.3.1. SENZITIVNOST IN SPECIFIČNOST TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

Idealen tumorski označevalec naj bi imel sledeče lastnosti:

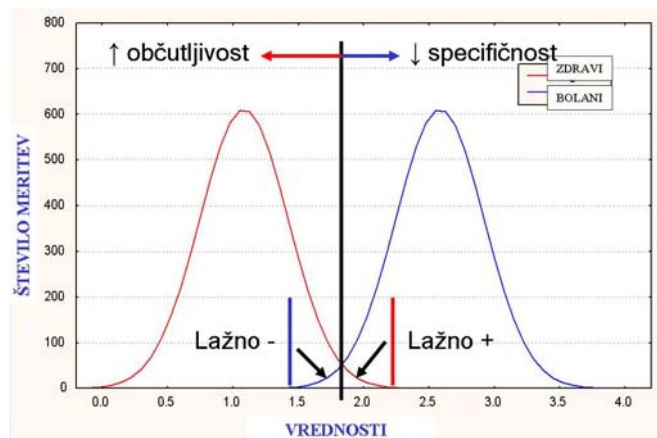
- označevalec naj bi tvorila samo maligna tumorska tkiva,
- vsak označevalec naj bi bil značilen za določen organ in tumor,
- označevalec naj bi bil dokazljiv pri vseh bolnikih z istovrstnim malignim tumorjem,
- označevalec naj bi se tvoril v zadostnih količinah, ki bi jih lahko zaznali že na začetni stopnji razvoja malignega tumorja,
- serumske koncentracije označevalca naj bi odražale velikost tumorske mase.

Vse do danes pa še ne poznamo antigenske strukture, ki bi obstajala samo v malignih tumorskih celicah, kar pomeni, da lahko protitelesa proti posameznim tumorskim označevalcem navzkrižno reagirajo tudi z drugimi antigenskimi strukturami. Zaradi tega ne moremo govoriti o povsem specifičnem označevalcu ali metodi za spremljanje prisotnosti malignih tumorskih celic. Pri vrednotenju rezultatov moramo vedno imeti v mislih, da maligna bolezen ni edini vzrok za povišane vrednosti tumorskih označevalcev, ampak da obstaja več faktorjev, ki vplivajo na njihovo koncentracijo.

Vlogo in uporabno vrednost posameznega tumorskega označevalca in metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom senzitivnosti in specifičnosti (Preglednica IV). **Senzitivnost** označevalca pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z določenim tumorjem je serumski (urinski, plazemski, likvorski) nivo označevalca povišan. Čim večji je delež bolnikov z istovrstnim tumorjem, pri katerih je nivo povišan, tem bolj senzitivni so označevalci, zato pričakujemo minimalno število lažno negativnih določitev. **Specifičnost** predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo določene maligne bolezni in imajo normalen nivo označevalca. To pomeni, da je označevalec tem bolj specifičen, čim manjkrat je prisoten pri ljudeh brez določene vrste tumorja oz. čim manj je lažno pozitivnih določitev.

Idealen tumorski označevalec naj bi bil potemtakem 100% senzitivni in specifični za vrsto maligne bolezni, njegova referenčna vrednost pa naj bi bila 0. Referenčna vrednost je tista arbitrarno določena koncentracija označevalca, nad katero govorimo o povišanih vrednostih. Ker kot tumorske označevalce zaenkrat uporabljamo snovi, ki so prisotne tudi v drugih celicah, je referenčna vrednost vedno večja od 0 in je postavljena tako, da dosežemo nek kompromis med specifičnostjo in senzitivnostjo označevalca. Večanje specifičnosti za določen označevalec pomeni istočasno zmanjšanje njegove senzitivnosti in obratno. Z

drugimi besedami, referenčno vrednost moramo postaviti tako, da imamo čim manj lažno negativnih in čim manj lažno pozitivnih rezultatov (Slika 4). Če je pri isti vrsti maligne bolezni mogoče določati več označevalcev, lahko z njihovo kombinacijo povečamo senzitivnost detekcije, vendar je pri tem treba upoštevati zmanjšano specifičnost. Pogoj za dobro kombinacijo različnih označevalcev je predvsem njihova visoka specifičnost in komplementarnost za isto vrsto tumorja. Doslej smo govorili o specifičnosti in senzitivnosti označevalcev za posamezno vrsto raka. Lahko pa tumorske označevalce uporabljamo za dokazovanje malignega procesa na splošno, kar pomeni, da nas ne zanima, za kakšno vrsto raka gre, ampak nas zanima le potrditev, da pri bolniku obstaja maligna bolezen. V takšnih primerih nas zanima predvsem senzitivnost detekcije, manj pa njena specifičnost. Zato se takrat odločamo za kombinacijo več označevalcev s čim manj lažno negativnimi določitvami oz. čim višjo senzitivnostjo (40).



Slika 4: Pomen občutljivosti in specifičnosti

Preglednica IV: Izračunavanje senzitivnosti in specifičnosti.

	Označevalec povišan	Označevalec normalen
Število bolnikov z določeno vrsto maligne bolezni	A	B
Število ljudi brez določene vrste maligne bolezni	C	D
občutljivost = $A / (A + B)$; specifičnost = $D / (C + D)$		

1.3.2. RAZDELITEV TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

Tumorske označevalce lahko razdelimo na več načinov: po kemični strukturi, po mestu nastanka, po vrstah tumorskih bolezni, pri katerih naj bi jih določali, itd. Najpogosteje uporabljena razdelitev poskuša strniti njihove biokemične lastnosti, mesto nastanka ter funkcionalnost.

Po tej razdelitvi ločimo naslednje tumorske označevalce:

- **onkofetalne proteine:** CEA - karcinoembrionalni antigen, AFP – alfafetoprotein,
- **hormone in/ali karcinoplacentarne antigene:** β HCG – beta horiontski gonadotropin,
- **encime:** PKF - prostatična kislina fosfataza, AF – alkalna fosfataza, NSE – nevronska specifična enolaza, LDH - laktatdehidrogenaza, γ GT – gamaglutamiltransferaza, TK – timidinkinaza,
- **tumor spremljajoče antigene:** CA 15-3 – karcinomski antigen, MCA – mucinski karcinomski antigen, CA 125 – karcinomski antigen, CA 19-9 – karcinomski antigen, PSA, – za prostato specifični antigen,
- **posebne serumske proteine:** TG – tiroglobulin, beta-2-mikroglobulin, S-100 protein,
- **skupino mešanih označevalcev:** TPA – tkivni polipeptidni antigen.

CA 19-9 - KARCINOMSKI ANTIGEN 19-9

Karcinomski antigen 19-9 (CA19-9) je glikolipid in je pravzaprav spremenjen Lewisov haptin iz sistema krvnih skupin. CA 19-9 je pogosto povečan v serumu bolnikov z gastrointestinalnimi tumorji. Monoklonska protitelesa proti tej mucinski antigenski determinanti reagirajo navzkrižno z različnimi mucinskimi molekulami, vendar samo pri osebah, ki imajo aktiven Lewis (Lea) gen. Pri osebah, pri katerih je ta gen neaktiven in so Le(a-b-), se ta antigenska determinanta sploh ne tvori in označevalec za spremljanje bolezni ni uporaben. Označevalec je sicer nekoliko bolj specifičen za rak trebušne slinavke in jeter, pogosto pa so serumske koncentracije CA 19-9 povišane pri bolnikih z rakom debelega črevesa, danke, želodca in jajčnikov. V relativno visokih koncentracijah ga je moč dokazati pri zdravih odraslih ljudeh v semenski tekočini, želodčnem soku, amnijski tekočini ter izločkih trebušne slinavke in dvanajstnika. Zato ga je smiselno določati le v serumu ali plazmi, kjer so koncentracije povišane le ob bolezenskih spremembah (40).

1.3.3. ALFAPROTEIN KOT TUMORSKI OZNAČEVALEC

Alfafetoprotein (AFP) so odkrili leta 1963 v serumu mišk s hepatocelularnim karcinomom. To je glikoprotein z molekularno maso okrog 70 KD, ki med embrionalnim razvojem nastaja v rumenjaki, celicah epitelija gastrointestinalnega trakta in jeter. Med nosečnostjo prehaja AFP preko plodove krvi v amnijsko tekočino in preko placente v materino kri. Pri nosečnicah so torej serumske koncentracije AFP odvisne predvsem od trajanja nosečnosti. Močno povišana serumska koncentracija AFP med nosečnostjo pa je lahko tudi znak za različne anomalije ploda ali za prisotnost večjega števila plodov. Pri odraslih zdravih osebah je AFP v krvi v izredno majhnih količinah. Normalne vrednosti AFP v serumu se vzpostavijo približno 9 mesecev po rojstvu. Povišane serumske koncentracije AFP (nad 10 ng/ml) pri odraslih zasledimo ob akutnem virusnem hepatitisu, jetrni cirozi, obstruktivnem ikterusu in pri nekaterih malignih boleznih, kot so rak trebušne slinavke, pljuč in želodca. Poseben pomen ima za spremljanje bolnikov s hepatocelularnim karcinomom, kjer so koncentracije nad 1200 ng/ml tako rekoč potrditev primarnega jetrnega (hepatocelularnega) karcinoma, ter bolnikov z neseminomskimi germinalnimi tumorji (specifičnost 60%). AFP je nespecifičen biološki označevalec za HCC, povečano koncentracijo ima 50 – 70% obolelih (40).

AFP je glikoprotein, ki vsebuje 4% karbohidratnih ostankov, z eno glikozirajočo stranjo pri asparaginskem ostanku. V serumu obstajajo tri glikozilirane variante, ki kažejo različne karbohidratne verige na tem mestu. Mikroheterogenost sladkornih ostankov je bila raziskovana z lecitinsko afinitetno elektroforezo in izoelektričnim fokusiranjem. Odkrili so različne karakteristike glikoformnih oblik pri malignih in benignih tkivih. Glikoformne oblike AFP se dajo določiti in razlikovati med sabo na podlagi njihove specifične afinitete za vezanje na lecitin. Najmočnejše se na lecitin veže **AFP-L3** (AFP iz HCC celic), z nekoliko manjšo afiniteto se veže **AFP-L2** (AFP iz neseminomskih germinalnih tumorjev) (41). Številne publikacije iz Japonske in ostalih Azijskih držav navajajo, da povečane serumske koncentracije AFP-L3 močnejše kot AFP korelirajo z napredujočo stopnjo HCC-ja, večjo portalno vensko invazijo in slabšo prognozo. V ZDA merijo celokupno koncentracijo AFP in AFP L-3. Številni vzroki lahko vplivajo na dvig koncentracije AFP, medtem ko je bilo v številnih študijah dokazano, da je dvig AFP L-3, 92% specifičen za HCC (42).

AFP pri diagnozi: Koncentracije AFP med 400 in 500 µg/l, so sedaj splošno sprejete kot optimalne vrednosti, pri katerih lahko ločimo HCC od kronične jerne bolezni. Pri začetnih vrednostih AFP nad 1000 µg/l dosežajo končne tudi do 10×10^6 µg/l pri približno 40% (43). V študijah je bilo dokazano, da se pojavljajo večje vrednosti AFP pri pacientih z virusno etiologijo v primarjavi z alkoholno boleznijo jeter. Večje koncentracije AFP se pojavljajo pri mlajših pacientih moškega spola (44).

AFP in presejanje: Po priporočilih ekspertnih skupin se izvaja merjenje koncentracije AFP in ultrazvok trebuha vsakih šest mesecev. Posebej pri bolnikih z visokim tveganjem za pojav HCC, tistim s HBV, HCV cirotičnimi jetri (45, 46).

AFP pri prognozi: Povečane vrednosti AFP pri HCC so negativni prognostični faktor, navadno spremljajo bolj agresivne tumorje. Skupaj z velikostjo in razširjenostjo tumorja, je AFP neodvisen faktor za napoved preživetja (47, 48). Preživetje pacientov s serumsko vrednostjo AFP >10,000 µg/l določeno pri diagnozi, je bilo signifikantno krajše, kot pri tistih z vrednostjo AFP <200 µg/l. (49). Vrednosti AFP >1000 µg/l so navadno povezane s slabšo prognozo tudi pri pacientih zdravljenih z resekcijo (50). Različne študije so dokazale, da ima AFP pomembno vlogo pri regulaciji rasti tumorja in celične diferenciacije in lahko stimulira proliferacijo človeških hepatoma celic, najverjetneje preko AFP receptorjev (51).

AFP pri spremljanju bolezni: Merjenje koncentracije AFP z namenom spremljanja bolezni pri bolnikih z začetno povišano vrednostjo, je dobro uveljavljeno. Pri popolni odstranitvi tumorja se navadno koncentracija AFP v treh do štirih dneh zmanjša na polovico začetne. Nepopolna resekcija pa podaljša čas zmanjšanja koncentracije AFP na polovico začetne in povzroča krajše preživetje. Vendar tudi doseganje normalnih vrednosti AFP ne pomeni popolne odstranitve tumorja. Bolezen po transplantaciji ali resekciji se lahko ponovi tudi pri normalni koncentraciji AFP. Vzrok za to so lahko prisotne mikrometastaze, ki so premajhne za produkcijo večje koncentracije AFP. Zmanjšanje koncentracije AFP je boljši in zgodnejši pokazatelj recidiva bolezni, kot merjenje velikosti tumorja s CT. Vzrok za to je lahko ostala fibroza in ostali faktorji, ki lahko otežijo interpretacijo CT slike (52).

1.3.4. DOLOČANJE TUMORSKIH OZNAČEVALCEV V SERUMU

Tumorski označevalci imajo v telesnih tekočinah nizke koncentracije in za njihovo dokazovanje potrebujemo visoko občutljivo tehnologijo. Tehnike, ki jih danes uporabljamo, temeljijo bolj ali manj na podobnem principu, to je na določanju kompleksov antigena in protiteles. Najbolj razširjene tehnike so radioimunska metoda, encimskoimunska in luminimetrično-imunska metoda. Med seboj se razlikujejo po spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa, in po načinu detekcije nastalih kompleksov. Vse našteje metode so prilagojene dokazovanju izredno nizkih koncentracij antigena, tako da velikih razlik v njihovi senzitivnosti ni. Specifičnost metod je v veliki meri odvisna od kvalitete protiteles ter od specifičnosti protiteles za posamezen antigen oziroma tumorski označevalec (40).

2. NAMEN DELA

Klinična uporabnost AFP kot tumorskega označevalca pri HCC bolnikih je kljub številnim narejenim študijam še vedno vprašljiva. V obdobju od leta 2006 do avgusta 2008 so na Gastroenterološki interni kliniki zbrali 48 pacientov, katerim je bila z ultrazvokom trebuha potrjena diagnoza HCC, sočasno so izmerili premer tumorja. Teste za oceno funkcijske sposobnosti jeter (AST, ALT, γ -GT, albumin) in hematološke teste so opravili po standardnih rutinskih postopkih ravno tako ob postavitvi diagnoze. Krvne serume bolnikov so shranili v skrinji pri temperaturi -20°C .

Namen naše študije je določiti klinični pomen določanja AFP pri bolnikih s HCC pri zbrani populaciji pacientov. Naše delo bo vključevalo:

- 1. V serumih bolnikov bomo s kemiluminiscenčno imunološko sendvič metodo izmerili koncentracijo AFP.**
- 2. Paciente bomo glede na izbrane kriterije razdelili v različne skupine in s statističnimi analizami določili pomen velikosti koncentracije AFP znotraj skupin in med skupinami. Ugotovili bomo, če so dodatni hematološki pokazatelji in velikost tumorja v morebitni korelaciji s koncentracijo AFP in nam pomagajo pri ugotavljanju stadija in napovedovanju poteka bolezni.**
- 3. Iz izmerjenih koncentracij AFP v celotni skupini bomo določili klinično uporabnost AFP z izračunom specifičnosti in občutljivosti.**

Pričakujemo, da bo koncentracija AFP v pozitivni korelaciji z velikostjo tumorja in višja v prisotnosti metastaz.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. OPIS ZBIRANJA PREISKOVANCEV

V Gastroenterološki interni kliniki v Ljubljani so od leta 2006 do avgusta 2008 zbrali 48 bolnikov s HCC. Diagnoza je bila narejena z UZ trebuha, sočasno je bil izmerjen premer tumorja. Če je bilo prisotno večje število novotvorb, smo pri zbiranju podatkov upoštevali tisto z največjim premerom. Kadar se diagnoze ni dalo določiti samo z UZ trebuha, je bila dodatno narejena še biopsija novotvorbe. Testi za oceno funkcijske sposobnosti jeter (AST, ALT, γ -GT, albumin) in hematološki testi so bili opravljeni po standardnih rutinskih postopkih, ravno tako ob postavitvi diagnoze. Ocena funkcijske sposobnosti jeter je bila narejena po Child-Pughovi klasifikaciji na Child A, Child B in Child C. Pri zbiranju podatkov so nas zanimali še etiologija, prisotnost metastaz, starost in spol bolnikov.

3.2. OPIS VZORCEV SERUMA

Ob postavitvi diagnoze so bolnikom vzeli periferno vensko kri, jo po standardnem postopku obdelali, da so dobili serum. Serum so shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zamrznjen serum se lahko hrani največ 2 leti. Po končanem zbiranju bolnikov smo v teh serumih izmerili koncentracijo AFP.

3.3. OPIS KEMILUMINISCENČNE IMUNOLOŠKE SENDVIČ METODE

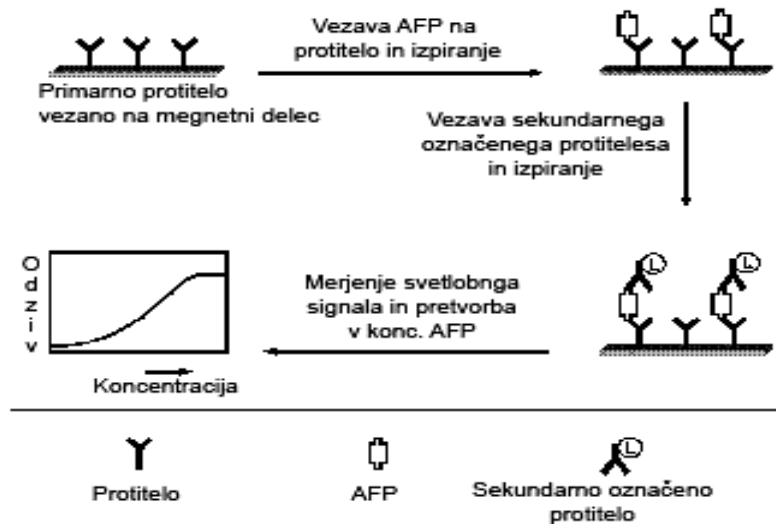
3.3.1. PRINCIP METODE

Kvantitativno določanje AFP poteka s kemiluminiscenčno imunološko sendvič metodo (Slika 5).

A) Imunokemijski del:

Specifična mišja monoklonska protitelesa so vezana na trden nosilec (magnetni delci); na sekundarno monoklonsko protitelo je vezan izoluminolni derivat (konjugat izoluminol-protitelesa). Med prvo inkubacijo se AFP, prisoten v vzorcu, veže na trdno fazo

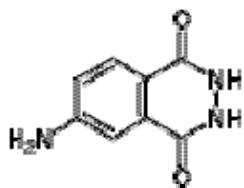
monoklonskega protitelesa. Sledi izpiranje in druga inkubacija pri kateri sekundarno protitelo reagira z AFP vezanim na trden nosilec. Po inkubaciji se nevezan material odstrani z izpiranjem. Vezan material na magnetnih delcih se ne izpere, ker jih pritegne magnet.



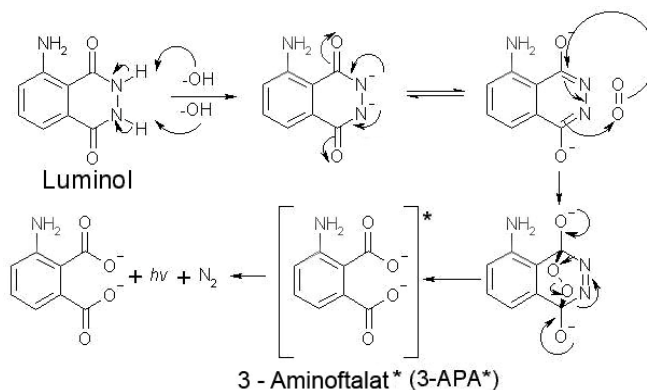
Slika 5: Kemiluminiscenčna imunološka sendvič metoda

B) Kemiluminiscenčni del:

Imunokemični reakciji sledi dodatek reagentov aktivatorjev (natrijev hipoklorit, natrijev hidroksid), ki sprožijo reakcijo kemiluminiscence. Natrijev hipoklorit ima vlogo katalizatorja. Reakcija oksidacije je predstavljena v *Shemi 1*, in sicer z luminolom, ker je potek enak kot pri izoluminolu (Spojina 1). Reakcija poteče tako, da najprej baza (-OH) pritegne protone na dušiku, nato pa pri oksidaciji s tripletnim kisikom dobimo 3-aminoftalat dianion v vzbujenem stanju, ki je po spinski naravi tripletno, ta prehaja v singletno spinsko stanje dianiona (še vedno vzbujeno) in nato v osnovno nevzbujeno stanje (tudi singletno). 3-APA ob prehodu v osnovno energetske stanje odda foton. Količina sproščene svetlobe je sorazmerna koncentraciji AFP. Svetlobni signal izmeri fotopomnoževalec v obliki relativnih svetlobnih enot, ki jih nato računalnik avtomatsko pretvori v vrednosti IU/ml= 1,21µg/l. Sproščeno energijo merimo pri 425 nm



Spojina 1: izoluminol



Shema 1: Potek reakcije oksidacije luminola

3.3.2. MATERIALI

Uporabljali smo komplet reagentov znamke LIAISON (314471), pripravljenih za direktno uporabo. V enem kompletu so bile količine za 100 določitev:

- 2,3 ml suspenzije magnetnih delcev – magnetni delci prekriti z mišjimi monoklonskimi AFP-protitelesi,
- 1,0 ml kalibratorja, nizek- za območje nizkih koncentracij,
- 1,0 ml kalibratorja, visok- za območje patoloških koncentracij,
- 23 ml raztopine sekundarnih protiteles – mišja monoklonska AFP-protitelesa, označena z izoluminolom,
- 23 ml reakcijskega pufra,
- 25 ml topila,

Ostali potreben material:

- Kontrola za oddano svetlobo LIAISON (319101),
- Tekočina za izpiranje LIAISON (319100),
- Reagenti aktivatorji LIAISON (319102),
- Multikontrola tumorskih označevalcev LIAISON (319109),
- Komplet za čiščenje LIAISON (310990),
- Vrečke za smeti,
- Brezprašne rokavice.

3.3.3. PRIPRAVA REAGENTOV IN VZORCEV

A) Priprava reagentov:

Pri vsakem novem odpiranju kompleta reagentov smo sledili navodilom proizvajalca. Pred odstranitvijo varnostnega tesnila smo vsebino horizontalno rahlo pretresli. Izogibali smo se

nastanku pene. Suspenzijo vsebnika z magnetnimi delci smo z vrtenjem zobatega kolesa na embalaži spremenili do rjave barve, kar je pomenilo, da so se magnetni delci suspendirali. Nato smo komplet reagentov postavili na ustrezno mesto v analizator in pred uporabo reagente pustili stati 30 min. Analizator je nato avtomatsko premešal in suspendiral magnetne delce.

B) Priprava vzorcev:

- Vzorčenje je potekalo po standardnih metodah.
- Vzorčni material je bil serum.
- Serum je bil shranjen samostojno, ločeno od sedimenta. Serum smo do uporabe zamrznili pod $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Shranjene vzorce smo pred izvajanjem metode dobro premešali (uporaba Vortexa).
- Hemolizirane ali lipemične vzorce in vzorce, ki so bili mikrobiološko kontaminirani, nismo uporabljali za določevanje AFP.
- Minimalni volumen vzorca potreben za enkratno določitev je bil $175\text{ }\mu\text{L}$.

3.3.4. KALIBRACIJA ANALIZATORJA

Kalibracija je primerjanje odziva instrumenta s standardom. Izvajamo jo z namenom zmanjševanja sistemske napake. V kompletu reagentov sta vključena tudi oba kalibratorja in sicer za nizko merilno območje in za patološko območje. Celoten postopek poteka avtomatsko, potrebno je bilo samo izbrati ustrezen ukaz v programu. Kalibracijo smo izvajali v sledečih primerih:

- vsakič pred začetkom merjenja,
- kadar je bil uporabljen nov komplet reagentov,
- vsake 14 dni,
- kadar so bile izmerjene kontrolne koncentracije izven pričakovanih vrednosti.

3.3.5. POTEK ANALIZE

Meritve smo opravljali na avtomatskem analizatorju LIASON proizvajalca DiaSorin iz Italije (slika 2). Za primeren potek metode smo sledili navodilom, ki jih je napisal proizvajalca analizatorja. Vsak testni parameter je bil identificiran s pomočjo kode napisane na etiketi reagentov.

Postopek analizatorja je bil sledeč:

1. 25 μL vzorca, kalibratorja ali kontrole,
2. + 200 μL reakcijskega pufra,
3. + 20 μL suspenzije magnetnih delcev prekritih z mišjimi monoklonskimi AFP protitelesi,
4. 10 min inkubacije, ki ji sledi cikel izpiranja,
5. + 200 μL raztopine sekundarnega protitelesa,
6. 10 min inkubacije, ki ji sledi cikel izpiranja,
7. 3s meritev.

Vsi reagenti in vzorec so bili odmerjeni avtomatsko. Prav tako računalniški program samodejno izračuna rezultat v željenih enotah, na podlagi umeritvene krivulje.



Slika 6: Avtomatski analizator LIAISON

3.3.6. SPECIFIČNE KARAKTERISTIKE NAPRAVE LIASON

a) **Analizna specifičnost:** izvedene kontrolne študije s potencialnimi snovmi, ki bi lahko vplivale na rezultat, so dokazale, da ne vplivajo na rezultat pri sledečih koncentracijah: bilirubin $\leq 216\mu\text{mol/l}$, hemoglobin $\leq 1,6\text{mg/l}$ ali trigliceridi $\leq 12,5\text{g/l}$.

b) **Natančnost:** Različni vzorci z različnimi koncentracijami AFP so bili analizirani za ocenitev ponovljivosti znotraj in med analiznimi postopki. Dobljeni rezultati so zbrani v preglednici V.

Preglednica V: Rezultati za ocenitev ponovljivosti znotraj in med analiznimi postopki

intra-analizna variacija			inter-analizna variacija		
povprečna vrednost (kU/l)	CV (%)	n (število merjenj)	povprečna vrednost (kU/l)	CV (%)	n (število merjenj)
19,9	2,3	20	24,1	2,9	9
77,3	2,3	20	67,8	6,5	8
241,8	1,5	20	93,6	5,2	13
461,5	2,2	20	252,3	6,7	12

c) **Točnost:** določena je bila z rečitvenim testom in testom ponovljivosti;

Rečitveni test: Vzorcem, ki so vsebovali visoke koncentracije AFP, je bil le ta izmerjen v neredčenem serumu, nato pa po različnih rečitvah z vzorčnim topilom. Pričakovane vrednosti meritev so bile določene z linearno regresijo. Rezultati so zbrani v preglednici VI.

Preglednica VI: Izmerjene vrednosti AFP v serumu pacientov po različnih rečitvah, osnovna koncentracija AFP = 614 (kU/l)

Redčenje	Izmerjene vrednosti (kU/l)	Pričakovana vrednost (kU/l)	Ponovljivost (%)
1 : 1,25	513,4	491,2	105
1 : 1,67	244,6	245,6	100
1 : 2,5	119,3	122,8	97
1 : 10	55,3	61,4	90

Test ponovljivosti: Vzorcem z različnimi koncentracijami AFP so bile opravljene meritve. Rezultati so zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII: Rezultati meritev različnih koncentracij AFP

Izmerjena vrednost (kU/l)	Pričakovana vrednost (kU/l)	Ponovljivost (%)
602,2	614,8	98
491,9	499,1	99
374,6	383,4	98
268,9	267,7	100
149,7	152,0	98

d) **Analizna občutljivost:** meja detekcije je 0,2kUAFP/l.

Kemiluminiscenčna imunološka sendvič metoda za določanje AFP v serumu je po vseh lastnostih, ki smo jih preverili (ponovljivost, linearnost...), primerna za določevanje AFP. Daje ponovljive rezultate v pričakovanih okvirih, izračunana specifičnost in občutljivost sta primerljiva s podatki iz literature.

4. REZULTATI

4.1.OVREDNOTENJE CELOTNE SKUPINE

V obdobju od leta 2006 do avgusta 2008 smo zbrali 48 pacientov s HCC, 43 moških in 5 žensk. Razmerje moški:ženske je 9:1. Povprečna starost je 66,7 let, najmlajši je star 50 in najstarejši 86 let. Etiologija je bila sledeča: HBV okužba= 2%; HCV okužba= 6%; ALKOHOL: 44%; OSTALO: 48%. Za HCC metastaziranje tumorja ni značilno, kar potrjuje tudi naša skupina pacientov, saj je 14,5% bolnikov imelo metastaze (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Vsi dobljeni podatki za zbrane bolnike

VZOREC	STAROST (leta)	VELIKOST TUMORJA (cm ³)	AFP [μg/l]	METASTAZE	ANAMNEZA	AST (μkat/L)	ALT (μkat/L)	CA-19-9 [kU/l]	γ-GT (μkat/L)	K-Hb (g/L)	ERIT [10 ¹² /l]	ALB (g/L)	TROMB [10 ⁹ /l]
1	54	4,2	465		07 diag, etilična ciroza-child A	2,24	2,54	/	1,32	137	4,41	36	150
2	69	58	514,9		doag 07, hepatitis C	1,26	1,31	19,7	2,92	136	4,28		142
3	74	113	260,9	okostje	karcinom prostate, ciroza child C	0,34	0,35	/	0,7	131	4,28	47	169
4	70	113	1108		odkrit 2006, diag 07, etilična ciroza-child A	0,87	0,52	/	2,21	120	4,8	43	101
5	65	113	8		etilična ciroza-child A	1,46	0,46	29,39	4,46	74	2,4		99
6	66	184	9		07 diag, etilična ciroza-child A	0,64	0,4	65,7	3,41	140	4,6	44	124
7	63	184	2,2		etilična ciroza-child A	0,31	0,32	7,5	1,28	92	3	32	174
8	56	231	21,9	okostje	08 diag, etilična ciroza-child A	0,84	0,71	/	4,05	89	3,26	31	127
9	69	272	1443,68	paraortalne in parakavarne	ciroza	1,03	0,52	9,28	2,86	143	4,64	34	108
10	69	358	546		odkrit 2006 (sum), diag 07, etilična ciroza-child A	1,02	0,72	/	4,44	100	4,5	40	192
11	58	358	851,8		3.07 postavitev diag, etilična ciroza-child A	1,12	0,76	41,5	5,31	130	3,69	40	166
12	61	382,5	2151,2		etilična ciroza-child A	1,47	0,75	51,9	1,8	134	3,59	24	104
13	64	387	59,8		8.5.08 diag, ciroza child C	2,99	2,58	10,5	0,63	134	4,19	26	61
14	77	525	178,12		07 diag, etilična ciroza-child A	0,29	0,37	5,7	0,46	110	3,6	43	/

VZOREC	STAROST (leta)	VELIKOST TUMORJA (cm ³)	AFP [μg/l]	METASTAZE	ANAMNEZA	AST (μkat/L)	ALT (μkat/L)	CA-19-9 [kU/l]	γ-GT (μkat/L)	K-Hb (g/L)	ERIT [10 ¹² /l]	ALB (g/L)	TROMB [10 ⁹ /l]
15	69	525	1754		prvic 2003,odstranjen operativno, ponovitev 06	0,52	0,71	/	1,19	156	4,84	43	184
16	60	525	71,7		8.7.08 diag, ciroza child B	1,02	0,59	7,1	7,55	139	3,78	33	116
17	59	525	2,4		07 diag (odkriti po krvavitvi v želodec)	0,5	0,41	20,6	8,1	101	2,98	41	85
18	57	525	259,2		"07 diag, etilična ciroza-child B	0,97	0,85	/	1,9	105	3,27	34	115
19	68	693	10000		5.07 postavljena diag,ciroza-child A	0,75	0,32	/	1,63	131	3,89	43	82
20	84	893	3,9		potrditev diag 07	0,81	0,37	10,8	1,72	148	4,85	/	304
21	71	1402	10,6		06 diag, etilična ciroza-child C	0,74	0,6	23,3	3,64	143	4,31	40	166
22	57	1402	1733		diag 06, alkoholna ciroza child C	0,52	0,4	183,9	1,63	144	4,36	43	150
23	72	1670	15519,2	kosti	07 diag	0,95	0,3	23,5	3,75	175	5,12	40	274
24	60	2138	4	mediastrum, pljuča	07 diag	1,38	1,03	7	3,43	139	3,94	41	514
25	59	2138	6,7		07 diag, etilična ciroza-child B	1,24	1,18	41,6	9,25	124	4,13	41	152
26	54	2138	30,01		ciroza child C-azbestoza, diag 07	0,49	0,29	284,5	5,47	85	2,7	/	67
27	77	2420	506,7		2.8.06-resekcija V. in VI. reznja,ciroza-child A	0,56	0,34	10,2	1,2	141	4,53	45	162
28	85	3922	2,6		07 diag, ciroza child B	1,47	1,06	16,4	17,69	108	3,78	31	323
29	69	4187	10		visok child B	1,34	0,48	43,5	1,62	144	4,28	27	191
30	62	6254	20,2		08 diag, etilična ciroza-child A	0,73	0,44	4	1,01	143	4,3	36	106

VZOREC	STAROST (leta)	VELIKOST TUMORJA (cm ³)	AFP [μg/l]	METASTAZE	ANAMNEZA	AST (μkat/L)	ALT (μkat/L)	CA-19-9 [kU/l]	γ-GT (μkat/L)	K-Hb (g/L)	ERIT [10 ¹² /l]	ALB (g/L)	TROMB [10 ⁹ /l]
31	61	7140	540,6	okstje	08 diag,	1,46	1,59	/	0,95	146	4,87	37	208
32	70	10184	33,5	v jetrih	08 diag, etilična ciroza-child A	1,01	0,62	7	4,07	140	4,6	39	388
33	75	11364	1,4		07 diag, ciroza-child B	1,61	2,65	10,8	1,04	108	3,57	36	454
34	53	13454	35,5		07 diag, etilična ciroza-child B	4,18	0,65	/	4,2	97	3,08		261
35	56	15592	4940,9		08 diag, etilična ciroza-child B	2,9	1,32	56,6	5,43	109	2,99	31	84
36	76	16882	35,4		hepatitis B, ciroza-child A	0,76	0,56	21,1	1,25	160	4,79	51	180
37	60	16882	467,5		odkrit 20.11.06	0,69	0,45	4,4	2,32	144	4,49	40	266
38	76	20272	141,6		4.08 postavljena diag, ciroza-child B	2,2	0,33	9	6,18	155	4,87	43	261
39	79	multifokalni HCC	4048		diag 07	1,58	0,69	131,9	8,4	125	3,6	34	200
40	72	multifokalni HCC	4224	nadledvičnice	etilična ciroza-child B	/	/	/	/	/	/	/	/
41	62	številne nekroze	918,5		07 dig, ciroza child B-C	2,35	1,07	72,8	6,41	137	4,47	29	295
42	74	številne okrogle formacije	120,2		07 diag	0,49	0,38	26,9	/	115	4,13	35	409
43	73	velika heterogena formacija	128,3		07 diag, dekompenzirana etilična ciroza child B	0,59	0,25	39,8	5,28	100	3,25	32	86
44	66	velika heterogena formacija	335,7	v desnih jetrih	07 diag	/	/	/	/	/	/	/	/

VZOREC	STAROST (leta)	VELIKOST TUMORJA (cm ³)	AFP [μg/l]	METASTAZE	ANAMNEZA	AST (μkat/L)	ALT (μkat/L)	CA-19-9 [kU/l]	γ-GT (μkat/L)	K-Hb (g/L)	ERIT [10 ¹² /l]	ALB (g/L)	TROMB [10 ⁹ /l]
45	56	velika heterogena formacija	5424		najprej karcinom laringsa T1 N1, sočasno HCC, ciroza child C	3,71	1,15	/	7,46	139	4,3	26	90
46	86	velika tumurozna formacija z nekrotičnim razpadom	1000		08 diag, zlatenica, ciroza-child C	/	/	/	/	/	/	/	/
47	85	zelo velik tumor	219,3		07 diag, ciroza-child C	2,02	0,91	15,7	2,77	128	4,53	42	253
48	50	zelo velik tumor	21	hilus jeter	07 diag, hepatitis C, ciroza child B	/	/	/	/	/	/	/	/

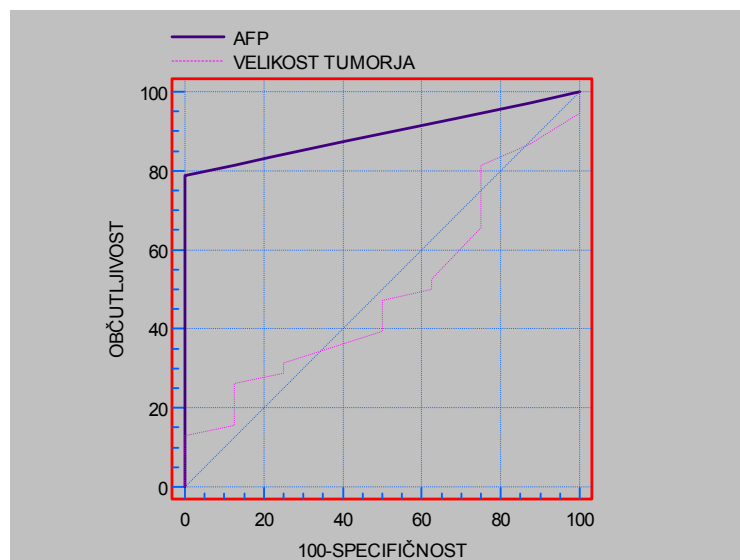
Na Gastroenterološki interni kliniki uporabljajo za referenčno vrednost AFP koncentracijo 8 μ g/l. 16,7% bolnikov je imelo koncentracijo AFP pod 8 μ g/l. Klinično uporabnost AFP kot tumorskega označevalca smo opredelili s pojmom specifičnosti in občutljivosti (Graf 1).

Izračun občutljivosti:

A= število bolnikov, ki imajo označevalec povišan pri maligni bolezni, B= število bolnikov, ki imajo označevalec normalen pri maligni bolezni

$$\text{občutljivost} = A/(A+B) = 40/48 = 0,833 = \underline{\underline{83,3\%}}$$

Površina pod ROC krivuljo (AUC) statistično pomeni verjetnost testa, da pravilno loči paciente z boleznijo od tistih brez, na osnovi izbranega parametra. V našem primeru gre za razlikovanje HCC bolnikov od tistih s kronično jetrno cirozo. Če je vrednost površine 1, pomeni dober test; površina 0,5 pomeni nesmiselni test. ROC krivuljo za našo skupino prikazuje Graf 1. Iz izračuna in iz Slike 7 je razvidno, da ima AFP zelo visoko občutljivost (83,3%), AUC= 0,895, pri upoštevanju referenčni vrednosti 8 μ g/l. ROC krivulja za VELIKOST TUMORJA, prikazuje da je VELIKOST TUMORJA nesmiselni parameter za razlikovanje.



Slika 7: ROC krivulja za [AFP] in VELIKOST TUMORJA

<p>ROC krivulja za [AFP] Površina pod ROC krivuljo= 0,895 Standardna napaka= 0,049 95% Interval zaupanja= 0,768 to 0,965</p>	<p>ROC krivulja za VELIKOST TUMORJA Površina pod ROC krivuljo= 0,495 Standardna napaka= 0,114 95% Interval zaupanja = 0,344 to 0,646</p>
---	---

Pri obdelavi podatkov smo zbrane paciente najprej razdelili v skupine, za katere smo predvidevali, da bi vrednosti AFP znotraj skupine bile signifikantno povečane ali bile v korelaciji s katerim od izmerjenih parametrov. Naredili smo 4 različne delitve, katerih izračuni so prikazani v nadaljevanju. V Preglednici IX so za boljšo preglednost predstavljene vse skupine in podatki, ki jih opredeljujejo. Vrednosti za velikost v skupini CHILD B in CHILD C nista primerljivi z ostalimi, ker vključujeta tudi paciente z multifokalnimi tumorji, kjer ni numerične vrednosti za velikost.

Preglednica IX: Prikaz vseh skupin

SKUPINA	Povp. [AFP]	% pod 8 $\mu\text{g/l}$ [%]	Spol [%]	Povprečna starost (leta)	N	Velikost tumorja [cm^3]
VSI	1151,35	16,7	90M; 10Ž	67	48	3852,88
MULTIFOKALNI	1643,9	/	70M;30Ž	70	10	/
METASTAZE	2546,25	14,3	100M	66	7	3106,85
BREZ MULTIFOKALNIH in BREZ METASTAZ	836,36	22,6	94M;6Ž	66	31	4021,3
[AFP] \leq 8 $\mu\text{g/l}$	3,9	100	88M;12Ž	69	8	2659,6
MED 8 in 400 $\mu\text{g/l}$	78,5	/	94M;6Ž	65	15	5150,8
NAD 400 $\mu\text{g/l}$	2836,16	/	100M	65	15	3181,3
CHILD A	424,07	14	100M	66	14	2728,05
CHILD B	820,24	25	100M	65	12	7997,66
CHILD C	1017,1	/	70M;30Ž	68	10	916,6

4.2. DELITEV BOLNIKOV V SKUPINE IN STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Statistika je temeljila na uporabi programa SPSS, računali smo statistično signifikacno z uporabo ANOVE. Za izpolnitev pogojev uporabe tega testa mora biti zagotovljena normalnost porazdelitve. Naši parametri znotraj skupin, ki smo jih oblikovali, niso zadostili pogoju zaradi majhnosti vzorca. Za uporabo ANOVE pri naši študiji se zato sklicujemo na študije iz člankov, ki so bile narejene na večjih vzorcih ($n=1000$), kjer je bila dokazana normalnost porazdelitve (53). Verjetnosti manjše od 0,05 smo vzeli za

signifikantne. Pri analizi signifikanc znotraj skupin in med posameznimi skupinami smo uporabili Post Hoc teste.

Multiple regresijsko analizo smo naredili s programom MedCalc, verzija 5.00.012, Software bvba. Korelacija in regresija preučujeta povezavo in medsebojno odvisnost med dvema ali več spremenljivkami. Korelacija opredeljuje moč, regresija pa obliko povezave. Glede na vrednosti korelacijskega koeficienta (R) ločimo naslednje povezave:

- (R) > 0 => premo sorazmerje spremenljivk (+)
- (R) ~ 0 => ni (linearne) povezanosti spremenljivk
- (R) < 0 negativen => obratno sorazmerje spremenljivk (-)
- (R) [-1.0, -0.7] ali [0.7, 1.0] => je močna povezanost!
- (R) [-0.3, -0.7] ali [0.3, 0.7] => je šibka povezanost!
- (R) [-0.3, -0.0] ali [0.0, 0.3] => ni povezanosti

Pri navajanju izračunov in rezultatov pri posameznih delitvah nismo napisali vseh narejenih, temveč samo tiste, ki so bili za naše zaključke pomembni. Ravno tako so narisani samo grafi s spremenljivkama, ki imata najboljšo sorazmernost znotraj skupin.

4.2.1. PRVA DELITEV

Najprej smo oblikovali posebno skupino, v kateri smo zbrali paciente z multifokalnim HCC. Te paciente smo ločili od ostalih, ker pri njih ni numeričnega podatka za velikost tumorja. V skupini z ostalimi bolniki smo naredili izračune multiple regresijske analize.

Rezultati multiple regresijske analize (Preglednica XX) :

V tej skupini ni pomembnih korelacij s koncentracijo AFP.

Vzorec je predstavljal 22 bolnikov.

Preglednica X: Rezultati multiple regresijske analize pri prvi delitvi

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
-0,040	γ -GT
-0,006	ALB
0,102	CA19-9
0,286	HB
0,042	TROMB
-0,041	VELIKOST TUMORJA

4.2.2. DELITEV GLEDE NA STADIJ TUMORJA

Glede na stadij tumorja smo razdelili bolnike v naslednje skupine: SKUPINA 1 - pacienti z multifokalnim HCC, SKUPINA 2 – pacienti z metastazami, SKUPINA 3 – pacienti brez multifokalnih in brez metastaz

V Preglednici XI so združeni podatki povprečnih vrednosti tistih parametrov, ki so bili za nas pomembni v smislu iskanja korelacij z AFP znotraj posameznih skupin. Največjo povprečno koncentracijo AFP je imela SKUPINA 2 (2546,25 μ g/l), najnižjo pa SKUPINA 3 (836,36 μ g/l). Povprečna velikost tumorja je bila največja v SKUPINI 3 (4021,3 cm^3).

Preglednica XI: Povprečne vrednosti pomembnih parametrov pri drugi delitvi

Povprečje	AFP [μ g/l]	CA19-9 [kU/l]	Velikost tumorja [cm^3]	γ -GT [μ kat/l]	AST [μ kat/l]	ALB [g/l]	HB [g/l]
BREZ MULTIFOKALNIH	2367,2	38,78	3853	3,5	1,19	38,03	127,7
SKUPINA 1 (MULTIF.)	1643,9	57,4		6,06	1,79	33	124
SKUPINA 2 (METASTAZE)	2546,25	13,26	3106,8	2,83	1	38,4	137,5
SKUPINA 3 (BREZ MULTIF. in brez METASTAZ)	836,36	40,8	4021,3	3,62	1,21	37,9	125,5

Rezultati ANOVE:

A) Ocena razlikovanja skupin glede na **KONCENTRACIJO AFP**

Pri ugotavljanju signifikantnosti velikosti koncentracije AFP med skupinami 1, 2 in 3, smo izračunali, da se skupine po vrednostih koncentracij med seboj statistično signifikantno ne razlikujejo ($p= 0,348$) (Preglednica XII). Pri primerjavi koncentracij AFP posamezno med skupinami tudi ni statistične signifikantnosti ($p> 0,05$). Največjo razliko kaže primerjava skupine 2 z 3 ($p=0,455$) (Preglednica XIII).

Preglednica XII: Izračun signifikantnosti glede na koncentracijo AFP za delitev glede na stadij tumorja

	Vsota kvadratov	df	Povprečje kvadratov	F	Sig.
Med skupinami	1,676E+07	2	8,378E+06	1,081	0,348
Znotraj skupin	3,486E+08	45	7,747E+06		

Preglednica XIII: Rezultati Post Hoc testov za drugo delitev

Odvisna spremenljivka:AFP						
	(I)	(J)	Std. napaka	Sig.	95% Interval zaupanja	
	Skupina	Skupina			Spodnja meja	Zgornja meja
Bonferroni	1	2	1380,91647	1,000	-4336,3905	2531,6819
		3	1019,06773	1,000	-1726,6633	3341,7323
	2	1	1380,91647	1,000	-2531,6819	4336,3905
		3	1172,61083	0,455	-1206,1370	4625,9146
	3	1	1019,06773	1,000	-3341,7323	1726,6633
		2	1172,61083	0,455	-4625,9146	1206,1370

B) Ocena razlikovanja skupin glede na VELIKOST TUMORJA

Primerjali smo samo skupino 2 in 3. Izračun pokaže, da se skupini glede na velikost tumorja signifikantno ne razlikujeta ($p=0,55$) (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Izračun signifikantnosti glede na VELIKOST TUMORJA za drugo delitev

	Vsota kvadratov	df	Povprečje kvadratov	F	Sig.
Med skupinami	16277,164	1	16277,164	0,364	0,550
Znotraj skupin	1609168,938	36	44699,137		

Rezultati izračunov korelacij in multiple regresijske analize

A) Multiple regresijske analize v SKUPINI 1 nismo delali, ker je številčno premajhna.

B) Multipla regresijska analiza v SKUPINI 2

V skupini z METASTAZAMI se kaže šibka korelacija med koncentracijo AFP in koncentracijo ERIT (0,545) ter koncentracijo HB (0,667) (Preglednica XV).

Vzorec je predstavljal 8 bolnikov.

Preglednica XV: Rezultati multiple regresijske analize za skupino z METASTAZAMI

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
0,256	γ -GT
0,111	ALB
0,545	ERIT
0,667	HB
-0,002	TROMB

-0,190	VELIKOST TUMORJA
--------	------------------

C) Multipla regresijska analiza v SKUPINI 3

V skupini BREZ METASTAZ IN BREZ MULTIFOKALNIH ni pomembnih korelacij z [AFP] (Preglednica XVI).

Vzorec je predstavljalo 24 bolnikov.

Preglednica XVI: Rezultati multiple regresijske analize za skupino BREZ METASTAZ IN BREZ MULTIFOKALNIH

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
0,041	γ -GT
0,061	ALT
0,104	CA 19-9
0,182	HB
-0,019	TROMB
-0,094	VELIKOST TUMORJA

4.2.3. *DELITEV GLEDE NA KONCENTRACIJO AFP*

Naredili smo 3 skupine in sicer: SKUPINA Z NORMALNO KONCENTRACIJO AFP (z [AFP] \leq 8 μ g/l), SKUPINA S POVEČANO KONCENTRACIJO AFP ([AFP] med 8 in 400 μ g/l) in DIAGNOSTIČNA SKUPINA ([AFP] \geq 400 μ g/l)

Referenčna vrednost 8 μ g/l je bila vzeta zato, ker jo uporabljajo tudi na Gastroenterološki interni kliniki. 400 μ g/l pa je mednarodno priznana kot diagnostična. Največjo povprečno velikost in koncentracijo CA 19-9 ima skupina z [AFP] med 8 in 400 μ g/l.

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti pomembnih parametrov pri delitvi glede na koncentracijo AFP

Povprečje	AFP [μ g/l]	CA19-9 [kU/l]	Velikost tumorja [cm ³]	γ -GT [μ kat/l]	AST [μ kat/l]	ALB [g/l]	HB [g/l]
[AFP] \leq 8 μ g/l	3,9	18,01	2659,6	5,9	1,09	37	111,75
[AFP] med 8 in 400 μ g/l	78,5	47,4	5150,8	3,07	1,303	38	127,6
[AFP] \geq 400 μ g/l	2836,2	44,6	3181,3	2,6	1,15	38,5	136,4

Rezultati ANOVE

A) Ocena razlikovanja skupin glede na **VELIKOST TUMORJA**

Skupine se glede na velikost tumorja signifikantno ne razlikujejo med seboj ($p=0,534$) (Preglednica XVIII). Primerjava med posameznimi skupinami glede na velikost ne pokaže nobenih signifikantnih razlik. ($p > 0,05$) (Preglednica XIX).

Preglednica XVIII: Izračun signifikantnosti glede na VELIKOST TUMORJA pri delitvi glede na koncentracijo AFP

	Vsota kvadratov	df	Povprečje kvadratov	F	Sig.
Med skupinami	4,323E7	2	2,161E7	0,639	0,534
Znotraj skupin	1,183E9	35	3,381E7		

Preglednica XIX: Rezultati Post Hoc Testov pri delitvi glede na koncentracijo AFP

Odvisna spremenljivka: VELIKOST						
	(I) Skupina	(J) Skupina	Std. napaka	Sig.	95% interval zaupanja	
					Spodnja meja	Zgornja meja
Bonferroni	1	2	2545,62658	1,000	-8892,3263	3909,8429
		3	2545,62658	1,000	-6932,7929	5869,3763
	2	1	2545,62658	1,000	-3909,8429	8892,3263
		3	2123,19934	1,000	-3379,3403	7298,4070
	3	1	2545,62658	1,000	-5869,3763	6932,7929
		2	2123,19934	1,000	-7298,4070	3379,3403

Opombe: 1= [AFP] \leq 8 μ g/l; 2= [AFP] med 8 in 400 μ g/l; 3= [AFP] \geq 400 μ g/l

Rezultati izračunov korelacij in multiple regresijske analize

A) Multipla regresijska analiza v skupini [AFP] \leq 8 μ g/l

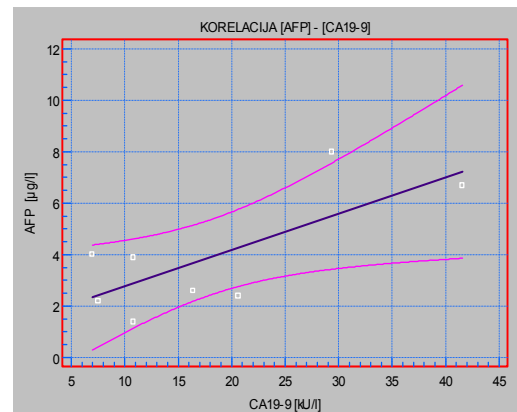
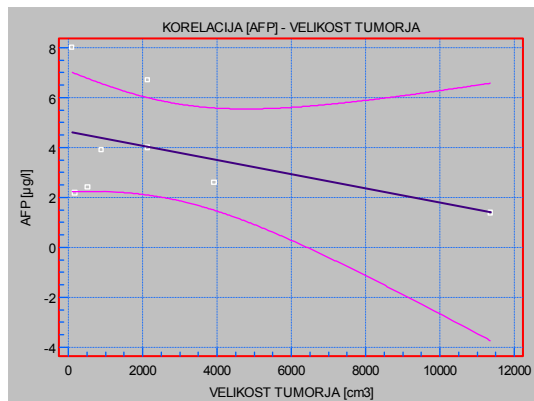
V skupini z [AFP] \leq 8 μ g/l s koncentracijo AFP najboljše korelira CA 19-9, korelacija je močna (R= 0,739) (Preglednica XX). Naraščanje [AFP] v odvisnosti z [CA 19-9] je prikazana na Sliki 9. Na Sliki 8 je prikazana odvisnost naraščanja [AFP] od

VELIKOSTI, njuna korelacija je šibka ($R = -0,459$). Predvidevamo, da je njuna odvisnost obratno sorazmerna, zaradi majhnosti vzorca.

Vzorec je predstavljal 8 bolnikov.

Preglednica XX: Rezultati multiple regresijske analize za skupino $[AFP] \leq 8 \mu\text{g/l}$

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
-0,459	VELIKOST TUMORJA
0,739	CA19-9
0,050	γ -GT
-0,128	ERIT
-0,136	HB
-0,416	TROMB



Slika 8: Prikaz korelacije med $[AFP]$ in VELIKOSTJO TUMORJA **Slika 9:** Prikaz korelacije med $[AFP]$ in $[CA 19-9]$

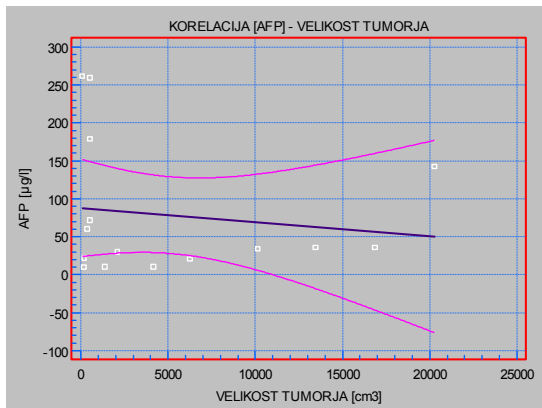
B) Multipla regresijska analiza v skupini $[AFP]$ med 8 in $400 \mu\text{g/l}$

V skupini $[AFP]$ med 8 in $400 \mu\text{g/l}$ je najboljša korelacija med $[AFP]$ in VELIKOSTJO TUMORJA, ki je šibka ($R = 0,578$). šibka korelacija je tudi med $[AFP]$ in $[\gamma\text{-GT}]$ ($R = 0,576$) (Preglednica XXI). Na Slikah 10 in 11 sta prikazani obe odvisnosti.

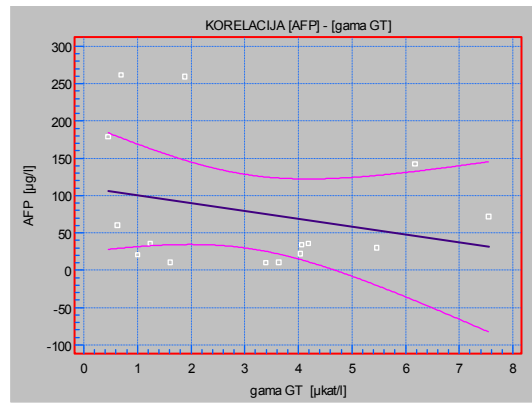
Vzorec je predstavljal 8 bolnikov.

Preglednica XXI: Rezultati multiple regresijske analize za skupino $[AFP]$ med 8 in $400 \mu\text{g/l}$

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
0,576	γ -GT
0,071	ALB
-0,544	CA19-9
0,302	HB
0,416	TROMB
0,578	VELIKOST TUMORJA



Slika 10: Prikaz korelacije med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA



Slika 11: Prikaz korelacije med [AFP] in [γ GT]

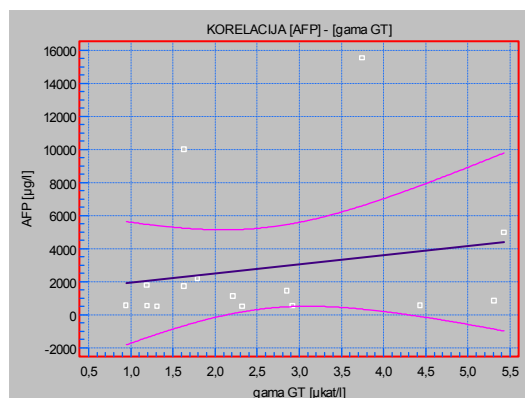
C) Multipla regresijska analiza v skupini [AFP] \geq 400 μ g/l

V skupini [AFP] \geq 400 μ g/l je šibka korelacija [AFP] z [γ -GT] (R= 0,321) (Preglednica XXII). Na Sliki 12 je prikazana njuna odvisnost.

Vzorec je predstavljal 8 bolnikov.

Preglednica XXII: Rezultati multiple regresijske analize za skupino [AFP] \geq 400 μ g/l

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
0,312	γ -GT
-0,002	ALB
-0,089	CA19-9
0,585	HB
0,440	TROMB
-0,074	VELIKOST TUMORJA



Slika 12: Prikaz odvisnosti med [AFP] in [γ GT]

4.2.4. DELITEV GLEDE NA OCENO FUNKCIJSKE SPOSOBNOSTI JETER

Pri delitvi smo upoštevali Child-Pughovo klasifikacijo za funkcijsko sposobnost jeter in oblikovali skupine: CHILD A (bolniki s cirozo Child A), CHILD B (bolniki s cirozo Child B) in CHILD C (bolniki s cirozo Child C).

Pri tej delitvi smo upoštevali tudi bolnike z multifokalnimi tumorji. Največjo povprečno koncentracijo AFP in CA 19-9 ima skupina bolnikov s cirozo Child C (Preglednica XXIII).

Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti pomembnih parametrov pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter

POVP	AFP [$\mu\text{g/l}$]	Velikost tumorja [cm^3]	CA 19-9 [kU/l]	γ -GT [$\mu\text{kat/l}$]	ALB [g/l]
CHILD A	424,1	2728,1	26,3	2,6	38,7
CHILD B	820,2	7997,6	28,1	6,0	34,2
CHILD C	1017,1	916,6	87,2	3,5	36,1

Rezultati ANOVE

A) Ocena razlikovanja skupin glede na KONCENTRACIJO AFP

Skupine CHILD A, CHILD B in CHILD C se po koncentraciji AFP statistično signifikantno ne razlikujejo med seboj ($p=0,566$) (Preglednica XXIV). Primerjava med posameznimi skupinami glede na koncentracijo AFP ne pokaže nobenih signifikantnih razlik ($p > 0,05$). Največjo razliko kaže primerjava skupine CHILD A s CHILD C ($p=0,541$) (Preglednica XXV).

Preglednica XXIV: Izračun signifikantnosti glede na koncentracijo AFP pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter

	Vsota kvadratov	df	Povprečje kvadratov	F	Sig.
Med skupinami	2229264,403	2	1114632,202	0,580	0,566
Znotraj skupin	6,347E7	33	1923297,704		

Preglednica XXV: Rezultati Post Hoc testov pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter

Odvisna spremenljivka:AFP						
	(I) Skupina	(J) Skupina	Standardna napaka	Sig.	95% Interval zaupanja	
					Spodnja meja	Zgornja meja
Bonferroni	1	2	545,57604	1,000	-1772,2278	979,8901
		3	574,20221	0,928	-2041,2884	855,2321
	2	1	545,57604	1,000	-979,8901	1772,2278
		3	593,80517	1,000	-1694,5624	1300,8437
	3	1	574,20221	0,928	-855,2321	2041,2884
		2	593,80517	1,000	-1300,8437	1694,5624

Opombe: 1= CHILD A, 2= CHILD B, 3= CHILD C

B) Ocena razlikovanja skupin glede na VELIKOST TUMORJA

Skupine CHILD A, CHILD B in CHILD C so glede na velikost statistično signifikantno med seboj različne ($p=0,035$) (Preglednica XXVI).

Preglednica XXVI: Izračun signifikantnosti glede na VELIKOST TUMORJA pri delitvi glede na oceno funkcijske sposobnosti jeter

	Vsota kvadratov	df	Povprečje kvadratov	F	Sig.
Med skupinami	2,235E8	2	1,118E8	3,821	0,035
Znotraj skupin	7,605E8	26	2,925E7		

Rezultati izračunov korelacij in multiple regresijske analize

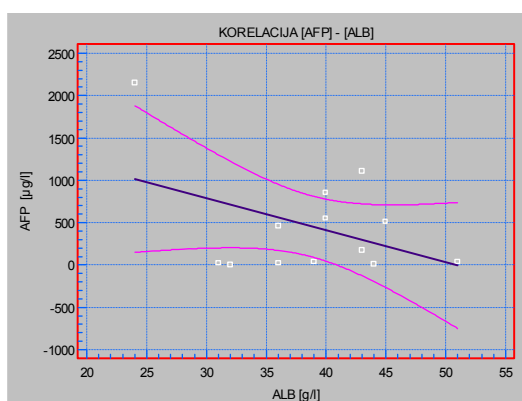
A) Multipla regresijska analiza v skupini CHILD A

V skupini CHILD A je **šibka** korelacija med [AFP] in [ALB] ($R=-0,413$). Korelacija je obratno sorazmerna (Preglednica XXVII). Njena odvisnost je prikazana na Sliki 13.

Vzorec je predstavljal 12 bolnikov.

Preglednica XXVII: Rezultati multiple regresijske analize pri skupini CHILD A

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
-0,019	γ -GT
-0,413	ALB
-0,108	ERIT
0,044	HB
-0,340	TROMB
-0,373	VELIKOST TUMORJA



Slika 13: Prikaz korelacije med [AFP] in [ALB]

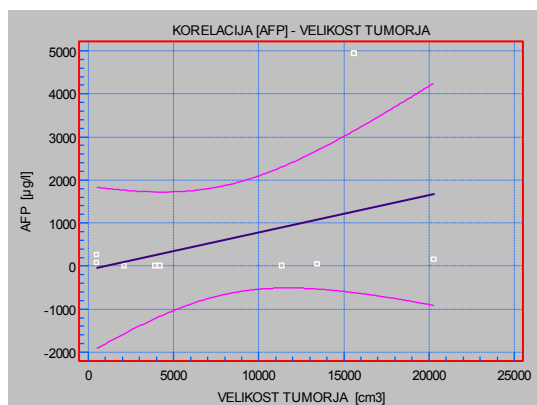
B) Multipla regresijska analiza v skupini CHILD B

V skupini CHILD B sta **šibki** korelaciji med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA ($R=0,447$) ter [AFP] in [ERIT] ($R=-0,582$) (Preglednica XXVIII). Poteka za obe odvisnosti sta na Slikah 14 in 15.

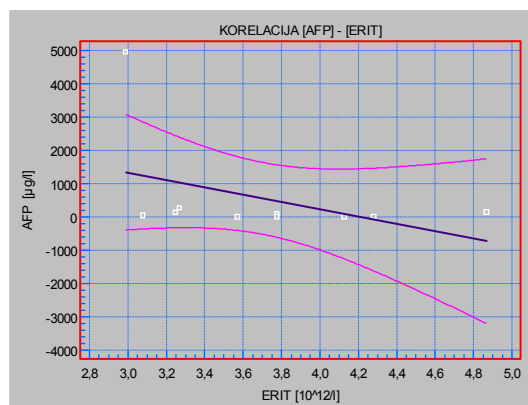
Vzorec je predstavljal 8 bolnikov.

Preglednica XXVIII: Rezultati multiple regresijske analize pri skupini CHILD B

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
-0,084	γ -GT
-0,254	ALB
-0,582	ERIT
-0,311	HB
-0,430	TROMB
0,447	VELIKOST TUMORJA



Slika 14: Prikaz odvisnosti med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA



Slika 15: Prikaz odvisnosti med [AFP] in [ERIT]

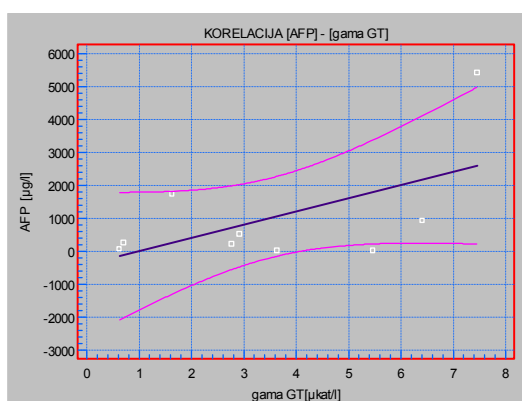
C) Multipla regresijska analiza v skupini CHILD C

V skupini CHILDC sta prisotni **šibki** korelaciji med [AFP] in [γ -GT] ($R=0,567$) ter med [AFP] in VELIKOSTJO TUMORJA ($R=0,397$) (Preglednica XXIX). Slika 16 prikazuje odvisnost [AFP] od [γ -GT].

Vzorec je predstavljal 9 bolnikov.

Preglednica XXIX: Rezultati multiple regresijske analize pri skupini CHILD C

Korelacijski koeficient	Neodvisna spremenljivka
0,567	γ -GT
0,297	HB
-0,199	TROMB
0,397	VELIKOST TUMORJA
0,023	ALT
0,579	AST



Slika 16: Prikaz korelacije med [AFP] in [γ -GT]

5. RAZPRAVA

Znanstvena literatura je polna poročil o specifičnosti in občutljivosti tumorskega označevalca AFP pri HCC. S strani različnih zdravstvenih organizacij (Evropsko združenje preučevanja jeter, Italijansko združenje preučevanja jeter) se še vedno pojavljajo vprašanja in nasprotujoča si mnenja o klinični uporabnosti AFP (53). Zato je bil namen naše študije določiti klinični pomen določevanja AFP pri HCC bolnikih zbranih v Gastroenterološki interni kliniki v Ljubljani. Drugi namen pa je bil odkriti možne signifikantne korelacije laboratorijskih parametrov in velikosti tumorja s povečano koncentracijo AFP. Upoštevali smo izmerjene koncentracije AFP in laboratorijskih parametrov ob postavitvi diagnoze.

V Gastroenterološki interni kliniki v Ljubljani so v letu in pol zbrali 48 pacientov (2,4/100.000 prebivalcev) s HCC. Najbolj pogost etiološki dejavnik je alkohol, prisoten je v 44%. Podatka se ujemata s splošnimi dejstvi, in sicer da je v zahodnem svetu ta bolezen manj pogosta (1,8 – 4/100.000 prebivalcev) in da je najpogostejši vzrok prekomerno uživanje alkohola. Če upoštevamo, da velikost tumorja $> 523\text{cm}^3$ (premer $> 5\text{cm}$), pomeni napredovali stadij bolezni, vidimo, da je bilo kar 73% bolnikov v naši populaciji, v napredovalem stadiju ob postavitvi diagnoze. Kar tudi pomeni, da je večina teh bolnikov imela zelo omejene možnosti za zdravljenje. Vzorec bolnikov je zaradi majhnega števila slabo reprezentativen, vendar nismo smeli podaljšati časa zbiranja bolnikov, ker se zamrznjen serum lahko hrani največ dve leti pri -20°C .

Vloga in uporabnost AFP kot tumorskega označevalca

Vlogo in uporabno vrednost posameznega tumorskega označevalca in metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom občutljivost in specifičnost. V naši skupini bolnikov smo izračunali občutljivost 83,3% in specifičnost 72% (površina pod ROC krivuljo = 0,895), pri referenčni vrednosti $8\mu\text{g/l}$. Kar pomeni, da imamo pri izbrani referenčni vrednosti 16,7% lažno negativnih rezultatov. Te bolnike bi ob diagnozi spregledali, če bi imeli koncentracijo AFP kot edino metodo za odkrivanje bolezni. Pomembno je, da se izbere optimalna vrednost za referenco, kar lahko glede na rezultate potrdimo v naši skupini. Če bi upoštevali večjo referenčno vrednost, bi imeli več lažno negativnih rezultatov. Sicer je priporočljiva referenčna vrednost za koncentracijo AFP $20\mu\text{g/l}$ in jo tudi v drugih državah največkrat uporabljajo (53). AFP lahko opredelimo kot

dober tumorski označevalec. Rezultati za občutljivost in specifičnost v ostalih študijah so nizke in sicer za občutljivost od 40 do 65% in za specifičnost od 76% do 96% (53). Vrednosti se spreminjajo glede na zasnovanost študije, populacijo pacientov in vzete referenčne vrednosti. Naša študija kaže v primerjavi z ostalimi dobro občutljivost (83,3%) in nekoliko slabšo specifičnost (72%).

AFP in velikost tumorja ter različni laboratorijski parametri

Rezultate koncentracij AFP, izmerjene v serumih bolnikov, smo razdelili glede na stadij tumorja, koncentracijo AFP in Child Pugh-ovo klasifikacijo, da bi ugotovili možne korelacije koncentracije AFP z velikostjo tumorja oz. s katerim od laboratorijskih parametrov.

Velikost tumorja je najpomembnejši parameter vsake klasifikacije tumorjev HCC. Večji kot je tumor in več kot jih je, slabša je prognoza. V skupini, kjer smo izločili bolnike z multifokalnim HCC, nam rezultati multiple regresijske analize niso pokazali korelacije koncentracije AFP z velikostjo tumorja. Pri delitvah v skupine pa se kaže šibka korelacija v skupini [AFP] med 8 in 400 μ g/l ($R= 0,578$), ter pri bolnikih s cirozo Child B ($R= 0,447$) in C ($R= 0,397$). Kar pomeni, da pri bolnikih s cirozo Child B in C oz. pri tistih s [AFP] med 8 in 400 μ g/l, ob večji koncentraciji AFP ob diagnozi lahko predvidevamo tudi večji tumor. Kar nakazuje na slabšo prognozo. Skupine CHILD A, CHILD B in CHILD C se statistično signifikantno razlikujejo glede na velikost tumorja. Bolniki s cirozo Child B imajo signifikantno večje tumorje, kot tisti s cirozo Child A oz. C. Največja razlika v vrednostih koncentracij AFP je bila pri delitvi v skupine: Z METASTAZAMI; MULTIFOKALNI in BREZ METASTAZ IN MULTIFOKALNIH ($p= 0,348$). Najbolj sta se med seboj razlikovali skupina MULTIFOKALNIH in skupina BREZ METASTAZ in MULTIFOKALNIH, vendar ne statistično signifikantno ($p= 0,447$). Zato ne moremo trditi, da večja koncentracija AFP ob diagnozi nakazuje na prisotnost metastaz niti ne na prisotnost večjega števila in večje velikosti tumorja. Med bolniki z velikostjo tumorja nad 523cm³ (premer ≥ 5 cm) ima 29% koncentracijo AFP znotraj referenčne vrednosti, 38% bolnikov pa ima diagnostično vrednost ([AFP] $\geq 400\mu$ g/l). Sklepamo lahko, da normalne vrednosti AFP ob diagnozi ne pomenijo, da tumor ni prisoten, kakor tudi, če je prisoten, ne pomenijo, da je velikost majhna. Naši rezultati in ugotovitve se ne ujemajo s pričakovanimi. Pričakovali smo, da bo koncentracija AFP v pozitivni korelaciji z velikostjo tumorja in večja ob prisotnosti metastaz.

Pri ugotavljanju možnih korelacij izbranih laboratorijskih parametrov z vrednostjo koncentracij AFP, smo se odločili za uporabo multiple regresijske analize ne pa tudi monovariantne. Razlog za navedeno izbiro je bil ta, da tovrstna analiza pri izračunu upošteva vse izbrane spremenljivke in prikaže moč korelacije ene spremenljivke na podlagi vseh ostalih. S tem izračunom smo lahko določili, kateri od laboratorijskih parametrov ima najboljšo korelacijo. Kot spremenljivke smo izbrali [ERIT], [HB], [CA19-9], [γ -GT] in [ALB], ter v primerih, ko je bila skupina majhna in ni bilo dovolj podatkov za izračun, še [ALT] in [AST]. V Preglednici XXX so za boljšo preglednost zbrane pomembne korelacije znotraj oblikovanih skupin. [ERIT] in [HB] sta parametra, ki opredeljujeta anemijo. Direktne korelacije med tema dvema parametroma in koncentracijo AFP nismo našli. Se pa kaže šibka povezava v skupini CHILD B (R za [ERIT]= - 0,582). V nasprotju z našimi pričakovanji so se pokazale tudi pozitivne korelacije med [ERIT] oz. [HB] in AFP (v skupinah METASTAZE, [AFP] med 8 in 400 μ g/l in [AFP] \geq 400 μ g/l). Ker pri bolnikih nismo uspeli dobiti podatkov o morebitnem zdravljenju pred postavitvijo diagnoze, lahko samo predvidevamo, da so ti bolniki dobivali transfuzijo oz. bili na terapiji z železom in imajo zato nepričakovane korelacije. Povišane vrednosti encima γ -GT v serumu so prisotne pri okvari hepatocitov. V skupinah [AFP] med 8 in 400 μ g/l ($R= 0,578$), [AFP] \geq 400 μ g/l ($R= 0,321$) in CHILD C ($R= 0,567$) so prisotne šibke korelacije med [AFP] in [γ -GT], iz česar sledi, da večje koncentracije AFP nakazujejo na večjo okvaro hepatocitov.

Preglednica XXX: Pomembne korelacije pri posameznih skupinah

SKUPINA	KORELACIJA [AFP] Z	R	N
Metastaze	[ERIT]	0,545= šibka	8
	[HB]	0,667= šibka	
[AFP] \leq 8 μ g/l	[CA19-9]	0,739= močna	8
	VELIKOST	-0,459= šibka	
[AFP] med 8 in 400 μ g/l	[γ -GT]	0,578= šibka	8
	[HB]	0,302= šibka	
	VELIKOST	0,576= šibka	
[AFP] \geq 400 μ g/l	[γ -GT]	0,321= šibka	8
	[HB]	0,585= šibka	
CHILD A	[ALB]	-0,413= šibka	12
CHILD B	[ERIT]	-0,582= šibka	8
	VELIKOST	0,447= šibka	
CHILD C	VELIKOST	0,397= šibka	9
	[γ -GT]	0,567= šibka	

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je se je v naši skupini 48 bolnikov s HCC, AFP izkazal kot dober tumorski marker z občutljivostjo 83,3% in specifičnostjo 72%, pri referenčni vrednosti 8 $\mu\text{g/l}$. Ob diagnozi izmerjene koncentracije AFP niso signifikantno različne znotraj posameznih skupin ($p > 0,05$), zato ne moremo trditi, da večja koncentracija AFP ob diagnozi nakazuje na prisotnost metastaz niti na prisotnost večjega števila in večje velikosti tumorjev. V skupinah [AFP] med 8 in 400 $\mu\text{g/l}$ ($R = 0,578$) ter pri bolnikih s cirozo Child B ($R = 0,447$) in C ($R = 0,397$) pa koncentracija AFP šibko korelira z velikostjo tumorja. To pomeni, da lahko pri teh bolnikih pričakujemo slabšo prognozo. Normalne vrednosti AFP ob diagnozi ne pomenijo, da tumor ni prisoten, kakor tudi če je prisoten, ne pomenijo, da je velikost majhna. Parametra za anemičnost ([ERIT] in [HB]) korelirata, znotraj posameznih skupin z AFP v pozitivno in negativno smer. Tu ne moremo narediti zaključkov zaradi manjkajočih podatkov o terapiji pacientov pred postavitvijo diagnoze. Večje koncentracije AFP nakazujejo na večjo okvaro hepatocitov pri bolnikih z vrednostjo $\text{AFP} > 8 \mu\text{g/l}$ ter pri tistih s cirozo Child C.

Naši rezultati in ugotovitve se ne ujemajo s pričakovanimi. Pričakovali smo, da bo koncentracija AFP v pozitivni korelaciji z velikostjo tumorja in večja ob prisotnosti metastaz. Za boljšo prezentativnost naših zaključkov bi bilo smiselno ponoviti študijo na večjem številu bolnikov. Ker je bolezen redka, bi morale sodelovati več bolnišnic, da bi hitreje zbrali več bolnikov. Smiselno bi tudi bilo preveriti klinično uporabnost AFP v kombinaciji s komplementarnim tumorskim markerjem, ki je povišan pri HCC bolnikih (npr. AFP L3), kjer bi lahko pričakovali še večjo občutljivost in specifičnost.

6. ZAKLJUČEK

Pogostost pojava HCC se je v Evropskem in Slovenskem merilu v zadnjih letih občutno povečala. Ker se vloga določanja AFP kot tumorskega označevalca pri bolnikih s HCC raziskuje že mnogo let, razprava o tem pa je še vedno odprta, smo se odločili proučiti klinično uporabnost AFP kot tumorskega označevalca v skupini bolnikov HCC zbranih v Gastroenterološki interni kliniki v Ljubljani. V omenjenem obdobju smo zbrali 48 bolnikov. V času postavitve diagnoze so z ultrazvokom izmerili velikosti tumorjev, po standardnih laboratorijskih postopkih so bile narejene tudi hematološke in biokemične analize. V zbranih serumih smo izmerili koncentracijo AFP. Iz dobljenih podatkov smo s pomočjo statističnih metod prišli do sledečih zaključkov:

- **Tumorski označevalec AFP ima za detekcijo HCC dobro občutljivost (83,3%) in specifičnost (72%). 50% bolnikov je imelo diagnostično vrednost ($> 400\mu\text{g/l}$) AFP. Rečemo lahko, da ima tumorski označevalec AFP v naši skupini HCC bolnikov dobro diagnostično uporabnost.**
- **Koncentracije AFP niso signifikantno višje v prisotnosti metastaz niti pri bolnikih z večjimi in številčnejšimi tumorji. Pri bolnikih s premerom tumorja $> 5\text{cm}$ ima 29% koncentracijo AFP znotraj referenčne vrednosti ter 38% bolnikov ima diagnostično vrednost. Sklepamo, da normalne vrednosti AFP ob diagnozi ne pomenijo, da tumor ni prisoten, kakor tudi če je prisoten, ne pomenijo, da je velikost majhna. Prisotne so šibke korelacije koncentracije AFP z velikostjo tumorja, zato lahko pričakujemo slabšo prognozo pri bolnikih s koncentracijo AFP med 8 in $400\mu\text{g/l}$ ($R= 0,578$) ter pri tistih s cirozo Child B ($R= 0,447$) in C ($R= 0,397$). Večje koncentracije AFP nakazujejo na večjo okvaro hepatocitov pri bolnikih z vrednostjo $\text{AFP} > 8\mu\text{g/l}$ ter pri tistih s cirozo Child C, kar sklepamo iz izračunanih šibkih korelacij med [AFP] in [$\gamma\text{-GT}$].**

Za boljšo reprezentativnost zaključkov bi bilo smiselno ponoviti študijo na večjem številu bolnikov. Ker je bolezen redka, bi morale sodelovati več bolnišnic, da bi hitreje zbrali več bolnikov. Smiselno bi tudi bilo preveriti klinično uporabnost AFP v kombinaciji s komplementarnim tumorskim markerjem, ki je povišan pri HCC bolnikih (npr. AFP L3), kjer bi lahko pričakovali še večjo občutljivost in specifičnost.

7. LITERATURA

1. Andreja Kocjančič, Franc Mrevlje, Dušan Štajer: Interna medicina, tretja izdaja 2005; 593 - 595, 628–632
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay Y, et al: Global cancer statistic, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55: 74–108
3. Lovet JM, Burroughs A, Bruix J.: HCC. Lancet. 2003; 362:1907–1917
4. Revija Slovenskega združenja za gastroenterologijo in hepatologijo: Gastroenterolog, letnik 7, številka 3, november 2003; 7, 29, 42
5. Ikeda K, Saintoh S, Koida I, et al: A multi variate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrosis. Hepatology.1993; 18(1):47-53
6. DiBisceglie AM, Carithers RL, Gores GJ: HCC. Hepatology 1998 28(4): 1161–1165
7. Chiamonte M, Stroffolini T, Vian A, et al.: HCC in primary biliary cirrhosis. J Hepatol 1994 21 (3): 315–316
8. Yuan JM, Govijandarajan S, Gao YT, et al.: Prospectiv evaluation of infection with hepatitis C virus in relation to HCC in Shanghai, China. J Infect Dis 2000; 182(5): 1300-1303
9. Fidler J.L, Stark D.D CT and MR imaging Startegies for Evaluation of Liver Tumors. Seminars in Interventional radiology 1997; 14 (3): 207–215
10. Choi B I, Park J. H; Kim B H e tal. Smal HCC: detection with sonography, CT, angiography and lipidiol CT. British Journal of Radiology 1989; 62: 897-903
11. Kalra M.K; Saini S, Rummeny E. Imaging of liver disease. Diseases of the abdomen and pelvis: Diagnostic Imaging and Interventional Techniques 2002; 25: 115–122
12. Ros P.R, Menu Y., Vilgrain V. et al. Liver neoplasms and tumor–like conditions. Eur.Radion 2001. 11 (Suppl. 2), 145–165
13. http://www.medicinenet.com/liver_cancer/page6.htm
14. Mazzaferro W, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of amall HCC in patints with chirrossis. N Engl J Med. 1996 Mar 14 ; 334(11): 693-9
15. Llovet JM, Bruix J, Fuster J, Castells A, Garcia-Valdecasas JC, Grande L, Franca A, Bru C, Navasa M, Ayuso MC, Sole M, Real MI, Vilana R, Rimola A, Visa J, Rodes J.

Liver transplantation for small HCC: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power. *Hepatology*. 1998 Jun; 27(6): 1572-7

16. Neuhaus J, Jonas S, Bechstein WO. Hepatoma of the liver-resection or transplantation? *Langenbecks Arch Surg*. 2000 Apr; 385 (3): 171–8

17. Stone MJ, Klintmalm GBG, Polter D et al.: Neoadjuvant chemotherapy and liver transplantation for HCC: a pilot study in 20 patients. *Gastroenterology* 1993; 104(1): 196–202

18. Makuuchi M. Remodeling the surgical approach to hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 2002; 49: 36-40

19. Fan ST. Methods and related drawbacks in the estimation of surgical risks in cirrhotic patients undergoing hepatectomy. *Hepato-Gastroenterology* 2002; 49: 17-20

20. Carr BI. Hepatic artery chemoembolization for advanced stage HCC: Experience of 650 patients. *Hepato-Gastroenterology*, 2002; 49: 79-86

21. Higashihara H, Okazaki M. Transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: a Japanese experience. *Hepato-Gastroenterology* 2002; 49: 72-8

22. Ishii H, Foruse J, Nakachi K, et al. Predictive factor of transcatheter arterial chemoembolization for HCC. *J Clin Oncol* 2007; 25(185)(suppl) (ASCO abstract 4541).

23. Livraghi T, Giorgio A, Marin G. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995; 197: 101-8

24. Lopez P M, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: Evidence – based management of HCC – an updated analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1535–47

25. Montorsi M, Santambrogio R, Bianchi P et al. Laparoscopic radiofrequency of hepatocellular carcinoma (HCC) in liver cirrhosis. *Hepato-Gastroenterology* 2001; 48: 41-5

26. Wilhelm S M, Karter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the Raf/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64:70, 99–109

27. Chang YS, Adnane J, Trail PA, et al. Sorafenib (BAY 43 – 9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 561–74

28. Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the Raf/MEK/ERK pathway inhibits tumor angiogenesis and induces tumor cell apoptosis in HCC model Plc/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 1851

29. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al; for the Sharp Investigators Study Group. Sorafenib improves survival in advanced HCC: results of a phase III randomized placebo – controlled trial (Sharp trial). *J Clin Oncol* 2007; 25 (185) (Suppl) (ASCO abstract LBA 1)
30. Feitelson MA, Pan J, Lian Z. Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy. *Surg Clin N Am.* 2004; 84; 339–354
31. Anzola M, HCC: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat.* 2004; 11: 383–393
32. Hwang YH, Choi YM, Kim S, et al. Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and HCC. *Hepatol Res.* 2004; 29: 113-121
33. Wiesenauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, et al. Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in HCC. *J Am Coll Surg.* 2004; 198: 410-421
34. Wong CM, Fan ST, Ng IO. β -catenin mutation and overexpression in HCC. *Cancer* 2001; 92: 136-45
35. Horie Y, Sutuki A, Kataoka E, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and HCC. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1774-1783
36. Hu T-H, Huang C-C, Lin P-R, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP in HCC. *Cancer* 2003; 97:1929-1940
37. Foster J, Black J, LeVea C, et al. COX-2 expression in HCC is an initiation event; while EGF receptor expression with downstream pathway activation is a prognostic predictor of survival. *Annals of Surgical Oncology.* 2006; 14:752-758
38. Samela D, Dufour J-F. Angiogenesis and HCC. *J Hepatol.* 2004; 41:864-880
39. Folkman J, Fundamental concepts of the angiogenetic process. *Curr Mol Med.* 2003; 3: 643-651
40. Prof. dr. Joško Osredkar. Izbrana poglavja iz klinične kemije, učno gradivo za študente farmacije, maj 2008
41. <http://en.wikipedia.org/wiki/AFP-L3>
42. Shiraki K, Takase K, Tameda Y, et al. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Hepatology* 1995;22:802-7. 2. Kumada T, Nakano S, Takeda
43. Liver cancer study group of Japan. The 15th report on nationwide follow-up studies of primary liver cancer. *Acta Hep Jap* 2003;44:157-175
44. Namieno T; Kawata A, Sato N, et al. Age-related, different clinicopathologic features of hepatocellular carcinoma patients. *Ann Surg* 1995;221:308-314

45. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology/Hepatobiliary Cancers v.2004 (<http://www.nccn.org/>)
46. Giovannini M, Elias D, Monges G; Raoul JL, Rougier P. Hepatocellular carcinoma. *BRJ Cancer* 2001;84 (S2):74-77
47. Andorno E, Salizzoni M, Schieron R, et al. Role of serum alpha-fetoprotein in per- and post-orthotopic liver transplantation (OLT) for malignant disease. *J Nucl Med All Sci* 1989;33:132-134
48. Ebara M, Ohto M, Shinagawa T, Sugiura N, Kimura K, Matsutani S, et al. Natural history of minute hepatocellular carcinoma smaller than three centimeters complicating cirrhosis. A study in 22 patients. *Gastroenterology* 1986; 90:289-298
49. Matsumoto Y, Suzuki T, Asada I, et al. Clinical classification of hepatoma in Japan according to serial changes in serum alpha-fetoprotein levels. *Cancer* 1982;49:354
50. Fuji Y, Taketa K, Aoi T, Taga H, Hirai H. Increased serum levels of monosialo-alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma and other malignancies. *Tumour Biol* 1993; 14: 319-324
51. Shian Jang Peng, Wei J Chen, Po-Lin Lai, Yun-Ming Jeng, Jin-Chuan Sheu, Hey-Chi Hsu, et al. High AFP level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of HCC: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and β -catenin mutations. *Int .J. Cancer*: 112, 44-50 (2004)
52. Johnson PJ, Williams R. Serum alpha-fetoprotein estimations and doubling time in hepatocellular carcinoma: influence of therapy and possible value in early detection. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64:1329-1332
53. Evi N. Debruyne, Joris R Delanghe: Diagnosing and monitoring HCC with AFP: New aspects and applicatons, *Clinica Chimica Acta*, Volume 395, Issues 1-2, September 2008, 19-26