

Izraženost glipikana-3, beta-katenina i CD34 u hepatocelularnom karcinomu bolesnika s transplantiranom jetrom

Lovrić, Eva

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:625928>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Lovrić, Eva (2012) *Izraženost glipikana-3, beta-katenina i CD34 u hepatocelularnom karcinomu bolesnika s transplantiranom jetrom [Expression of glypican-3, beta-catenin and CD34 in hepatocellular carcinoma in patients with orthotopic liver transplantation]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1808>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Eva Lovrić

**Izraženost glipikana-3, beta-kačenina i
CD34
u hepatocelularnom karcinomu bolesnika
s transplantiranom jetrom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2012.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Eva Lovrić

**Izraženost glipikana-3, beta-ksenina i
CD34
u hepatocelularnom karcinomu bolesnika
s transplantiranom jetrom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

**Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, Kliničke bolnice
“Mercur” u Zagrebu**

Voditelj rada: dr.sc. Ana Borovečki, dr.med.

Najveće hvala, mojoj mentorici dr. sc. Ani Borovečki, dr.med., na dobroj volji, strpljenju, razumijevanju, savjetovanju, angažiranosti, brzini, trudu i vremenu uloženom u pomoći oko izrade ovog rada.

Hvala Suzani, Tanji, Bibi na pripremi preparata i izvedenoj imunohistokemiji.

Zahvaljujem mr.sc. Zoranu Šiftaru, spec.medicine biokemije na pomoći oko prikupljanja laboratorijskih podataka.

Hvala mom kolegi, Petru Škaviću, dr.med. na tehničkoj pomoći oko izrade gotove disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 HEPATOCELULARNI KARCINOM.....	1
1.1.1 Definicija i epidemiologija.....	1
1.1.2 Morfološke karakteristike hepatocelularnog karcinoma i prezloćudnih promjena jetre...2	
1.1.3 Etiologija i čimbenici rizika.....	5
1.1.4 Molekularna patogeneza.....	7
1.1.5 Klinički pristup i liječenje.....	9
1.2 GLIPIKAN -3.....	11
1.3 BETA - KATENIN.....	13
1.4 CD34.....	16
2. HIPOTEZA.....	17
3. CILJEVI RADA.....	18
4. ISPITANICI I METODE.....	19
4.1 Ispitanici.....	19
4.2 Metode.....	21
4.2.1 Morfološka analiza.....	21
4.2.2 Izrada tkivnog <i>microarray</i> (<i>tissue microarray</i> TMA).....	22
4.2.3 Imunohistokemijsko bojanje i analiza.....	22
4.2.4 Statistička analiza.....	23
5. REZULTATI.....	24
6. RASPRAVA.....	47
7. ZAKLJUČCI.....	53
8. SAŽETAK.....	54
9. SUMMARY.....	55
10. LITERATURA.....	56
11. BIOGRAFIJA.....	69

POPIS KRATICA

ADCC - protutijelima ovisna stanična citotoksičnost (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

AFP – alfafetoprotein

AFP mRNA –alfafetoprotein glasnička ribonukleinska kiselina (*alfafetoprotein messenger ribonucleic acid*)

APC –adenomatozna polipoza crijeva (*adenomatous polyposis coli*)

BCLC - *The Barcelona-Clinic Liver Cancer*

CD – diferencijacijski antigen (*cluster of differentiation*)

DKKs - *dickkopfsa*

FGF – fibroblastični faktor rasta (*fibroblast growth factor*)

FNH – fokalna nodularna hiperplazija (*focal nodular hyperplasia*)

FZD - *frizzled*

GPC3 – *glypican 3*

GSK - *glycogen synthase kinase*

HA –hepatalni adenom (*hepatal adenoma*)

HBV – hepatitis B virus

HBs-Ag – HBs antigen

HBV DNA – HBV deoksiribonukleinska kiselina (*deoxiribonucleic acid*)

HBxAg – HBx antigen

HCK – hepatocelularni karcinom

HCV – hepatitis C virus

H&E – hemalaun eosin

HGF – faktor rasta hepatocita (*hepatic growth factor*)

HSPGs – heparan sulfat proteoglikani (*heparan sulfate proteoglycans*)

IGF – faktor rasta sličan inzulinu (*inzulin-like growth faktor*)

IGF 2 receptor – receptor faktora rasta sličnog inzulinu 2

IL - 6 – interleukin 6

LDLT - jetrena transplantacija sa živućeg donora (*living donor liver transplantation*)

LEF - limfoidni pojačavajući faktor vezanja (*lymphoid enhancer factor*)

LOH – gubitak heterozigotnosti (*lost of heterosigoty*)

MELD- model za krajnji stadiji jetrene bolesti (*model for end-stage liver disease*)

MMP – matriks metaloproteinaze

NASH – nealkoholni steatohepatitis

NK – prirodno ubilačke stanice (*natural killer*)

OCI-5 - mišji homolog GPC3

OLT – ortotopična transplantacija jetre (*orthotopic liver transplantation*)

PD-ECGF – endotelni faktor rasta porijekla trombocita (*platelet derived endothelial growth factor*)

Rb - retinoblastom

RFA - radiofrekventna ablacija

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (*reactive oxygen species*)

SGBS - Sumpson-Golabi-Behmel sindrom

SULF – sulafataze

TACE – transarterijska kemoembolizacija (*transarterial chemoembolization*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TGF α i β - transformirajući faktor rasta alfa i beta (*transforming growth factor alpha and beta*)

TCF - T stanični specifični faktor (*T cell-specific factor*)

TMA - tkivni *microarray* (*tissue microarray*)

TNM – tumor, limfni čvorovi, metastaze (*tumor, node, metastasis*)

UCSF - *University of California, San Francisco criteria*

UNOS - *United Network for Organ Sharing*

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (*vascular endothelial growth factor*)

VVP – veliko vidno polje

Wg - *Wingless*

1. UVOD

1.1 HEPATOCELULARNI KARCINOM

1.1.1 Definicija i epidemiologija

Hepatocelularni karcinom (HCK) je epitelna zloćudna novotvorina s prisutnom hepatocelularnom diferencijacijom i najčešća je primarna zloćudna novotvorina jetre (1). HCK po učestalosti zauzima šesto mjesto u svijetu u skupini svih zloćudnih novotvorina, a zbog brze progresije i lošeg ishoda nalazi se na trećem mjestu po uzroku smrtnosti od zloćudnih novotvorina (1, 2).

U svijetu se ukupno godišnje dijagnosticira 500 000 do 1 000 000 novih slučajeva HCK. HCK pokazuje izrazitu zemljopisnu i dobnu različitost u incidenciji, što je uvjetovano zemljopisnom različitosti zastupljenosti glavnih rizičnih čimbenika hepatitis B (HBV) i C (HCV) virus infekcije (1, 2, 3, 4). Visoku incidenciju HCK-a 20-52/100 000 novootkrivenih slučajeva imaju istočna Azija i subsaharska Afrika, te se u tim područjima pojavljuje više od 80% svih slučajeva HCK-a, od čega 55% slučajeva u Kini (1, 2, 4). Srednju incidenciju HCK-a nalazimo u zapadnoj Aziji, središnjoj Americi, Karibima, istočnoj Europi, Italiji, Rumunjskoj, Peruu, Češkoj i Slovačkoj Republici, Poljskoj i Rusiji (1, 4). Regije niske incidencije s manje od 5-7/100 000 novootkrivenih slučajeva su Sjeverna i Južna Amerika, južna i središnja Azija, sjeverna Europa, Australija i Novi Zeland (4).

HCV je najčešći uzrok HCK-a u Europi, Japanu i Sjevernoj Americi (1, 2, 4). Kronični nositelji HBV infekcije, učestalije muškarci, su zaraženi pri rođenju ili u početnim mjesecima života te imaju 12 puta veći rizik nastanka HCK, što je opaženo u tajvanskih nositelja HBV infekcije uz postojanje popratne ciroze jetre (1, 4). U područjima u kojima je učestalost kroničnih nositelja HBV infekcije niska, infekcija je nastala u odrasloj dobi u ljudi sa specifičnim rizičnim ponašanjem - intravenski narkomani, višebrojni seksualni partneri, homoseksualci (1, 5). U zemljama s visokim rizikom za pojavu HCK-a, HCK se javlja prije 20-te godine, suprotno u zemljama s niskim rizikom HCK-a se javlja iznad 50-te godine života (6). Općenito HCK se učestalije pojavljuje u dobi iznad 40 godina te u muškaraca, navedena razlika se pripisuje antinovotvorinskim svojstvima estrogena i pojačanim lučenjem interleukina 6 (IL-6) kod muškaraca pri čemu ovaj citokin sudjeluje u nastanku HCK-a (1, 6, 7).

1.1.2 Morfološke karakteristike hepatocelularnog karcinoma i prezloćudnih promjena jetre

HCK može nastati u normalnoj, necirotičnoj jetri bez kronične bolesti (20% slučajeva), međutim uglavnom nastaje u cirotičnom tkivu jetre (80% slučajeva) (3, 8-11).

Makroskopske osobine HCK-a ovise o prisutnosti ili odsutnosti popratne ciroze (4). Većinom je to čvorasta zloćudna novotvorina, u obliku jednog ili više žarišta, zelenkaste ili žućkaste boje ovisno o nakupljanju žučnog pigmenta, masti ili glikogena u citoplazmama zloćudnih hepatocita (4, 12). Na prerezu je HCK mekan, s prisutnom različito izraženom nekrozom, uz moguću nerijetku zahvaćenost portalne vene ili jetrenih vena. HCK se može širiti limfatičnim i hematogenim načinom. Pluća su najčešće mjesto izvanjetrenog metastaziranja, zatim slijede limfni čvorovi, kosti i nadbubrežna žlijezda.

U prisutnosti ciroze HCK često ima vezivnu pseudočahuru. Portalni prostori se ne vide već se nalaze na njegovoj periferiji. Morfološki, prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2009. godine razlikujemo klasični HCK i specifične tipove - fibrolamelarni, scirozni, nediferencirani, sličan limfoepiteliomu i sarkomatoidni tip. Klasični HCK čine zloćudne stanice slične hepatocitima, a stroma se sastoji od sinusoidama sličnih žilnih prostora, obloženih jednim redom endotelnih stanica koje pokazuju promjene u smislu kapilarizacije uz prisutnu imunohistokemijsku izraženost CD34. Fibrolamelarni tip HCK-a češće nastaje u mlađih osoba (prosječna dob 25 godina), čini 0.5-9% HCK-a, nastaje u necirotičnoj jetri i bolesnici sa ovom novotvorinom imaju bolji ishod u usporedbi sa klasičnim HCK-om. Makroskopski se u središnjem dijelu ovog tipa HCK-a redovito nalazi centralni vezivni ožiljak, a zloćudne stanice su velike, eozinofilne, onkocitnog izgleda (4). Scirozni tip HCK-a čini oko 5% HCK-a, karakteriziran je obilnom fibrozom duž sinusoidama-sličnih žilnih prostora (4, 12). Nediferencirani tip HCK-a čini manje od 2% svih HCK-a, dijagnosticira se imunohistokemijski i bolesnici s ovakvom zloćudnom novotvorinom jetre imaju lošiji ishod u usporedbi s ostalim tipovima HCK-a. Limfoepitelijalni tip HCK-a je rijedak, građen je od zloćudnih hepatocita i brojnih limfocita. Sarkomatoidni tip HCK-a je građen od vretenastih stanica i ponekad ga je teško razlikovati od različitih sarkoma. HCK koji pokazuje sarkomatoidnu diferencijaciju, učestalije u HCK-u nakon ponovljenih ciklusa kemoterapije ili transarterijalne kemoembolizacije, zove se sarkomatoidni HCK.

HCK pokazuje arhitekturalnu i citološku različitost, uz često vidljive njihove različite kombinacije. Arhitekturalno razlikujemo trabekularan, pseudožlijezdani i solidni tip (4). Trabekularni tip je najčešći u dobro i umjereno diferenciranim HCK-ma. Zloćudne stanice

rastu u tračcima različite debljine, razdvojene sinusoidama-sličnim žilnim prostorima bez prisutne retikulinske mreže. Pseudožlijezdani ili acinarni tip čine žlijezdane formacije koje predstavljaju abnormalne žučne kanaliće između zloćudnih stanica. U solidnom tipu HCK-a, sinusoidama-slični žilni prostori su neuočljivi, te daju HCK-u solidni izgled. Prema citološkom izgledu zloćudne stanice mogu biti pleomorfne, svijetle, vretenaste, masno promjenjene, stanice s žučnim pigmentom, hijalnim tjelešcima, svjetlim tjelešcima i inkluzijama poput mliječnog stakla „*ground-glass*“ koje sadržavaju hepatitis B površinski antigen (HBsAg) te tamno-smeđi pigment koji se povezuje s Dubin-Johnsonovim sindromom.

Histološko stupnjevanje HCK-a temelji se na diferencijaciji zloćudne novotvorine te razlikujemo dobro, umjereno, slabo i nediferencirani tip HCK-a. Dobro diferencirani HCK je češći u malim, ranim HCK-ima veličine do 2 cm, građen od stanica umjerene atipije i povišenog omjera jezgre – citoplazme, trabekularnog rasta debljine tri stanice ili više uz prisutne pseudožlijezdane formacije. Umjereno diferencirani HCK se učestalo pojavljuje u HCK-ima većim od 3 cm, trabekularne je građe s tri ili više stanica debljine. Slabo diferencirani HCK je vrlo rijedak u malim, ranim HCK-ima solidnog načina rasta bez sinusoidama-sličnih žilnih prostora. Zloćudne stanice u slabo diferenciranom HCK-u pokazuju izraziti pleomorfizam (4, 12). U nediferenciranom HCK-u zloćudne stanice sadržavaju malo citoplazme, vretenastog su izgleda i solidnog rasta. HCK pokazuje arhitekturne i citološke varijacije čak i unutar jednog zloćudnog čvora. HCK-i manji od 1 cm učestalije su građeni od dobro diferenciranih zloćudnih stanica, dok su HCK-i veličine 1-3 cm građeni od zloćudnih stanica različitog stupnja diferenciranosti.

Prezloćudne promjene su displastična područja karakterizirana mikroskopski vidljivim citološkim promjenama i displastični čvorovi vidljivi makroskopski (4). Displastična područja veličine 1-2 mm mogu se vidjeti unutar cirotičnih čvorova, a češće se vide u bolesnika sa HBV-om i HCV-om, te u bolesnika sa nedostatkom alfa-1-antitripsina (12). Displastična područja uključuju male i velike stanične promjene koja predstavljaju povećan rizik za nastanak HCK-a (4). Male stanične promjene ili u prošlosti nazivane malostanična displazija su karakterizirane većom proliferativnom aktivnošću nego okolni hepatociti, hepatociti su smanjenog volumena, povećane jezgre, umjerene pleomorfije i hiperkromazije i pojačane bazofilije citoplazme (4, 12). Opisane malostanične promjene se češće vide u regenerativnim čvorićima (12). Velike stanične promjene ili nekadašnji naziv velikostanična displazija je karakterizirana povećanjem jezgre i citoplazme, omjer jezgre i citoplazme je očuvan, pleomorfizmom i hiperkromazijom jezgre te multinuklearnošću (4, 12). Opisane morfološke promjene se učestalije vide u prezloćudnim promjenama.

U cirotičnoj jetri, benigni čvorovi, veći od tipičnih cirotičnih čvorova se nazivaju regenerativnim čvorovima. Veliki regenerativni čvorovi su veličine 0,8 do 1 cm, a manji od 3 cm. Imaju održanu retikulinsku mrežu, negativni su na AFP i imaju veći broj arterija uz nedostatak ostalih komponenti portalnih prostora. Velike regenerativne čvorove ponekad je teško razlikovati od čvorića sa malostaničnom displazijom, a dokazivanje klonalnosti ponekad je jedini mogući mehanizam koji pomaže u dijagnozi (12).

Displastični čvorovi se učestalo vide u cirotičnoj jetri, ali i u kroničnoj jetrenoj bolesti bez ciroze. Mogu se naći kao pojedinačni ili multipli čvorovi, uočljivih ili neuočljivih rubova, od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara, često manji od 15 mm. Makroskopski se razlikuju bojom i veličinom prema ostalom cirotičnom jetrenom tkivu. Displastični čvorovi se na temelju stupnja atipije dijele na čvorove niskog i visokog stupnja diferenciranosti. Mikroskopski su displastični čvorovi hipercelularne građe, u kojima se mogu vidjeti portalni prostori, te u kojima se može nakupljati željezo, bakar i masne kapljice. U displastičnim čvorovima se mogu vidjeti male ili velike stanične promjene, svjetla promjena stanica i nakupljanje Malorijevog hijalina. Displastični čvorovi visokog stupnja diferenciranosti mogu pokazivati strukturalne atipije, obično pseudožljezdane formacije. Prisutnost klonalnih stanica u velikim čvorovima govori češće u prilog displastičnog čvora nego regenerativnog čvora, a bolesnici s displastičnim čvorovima su u većem riziku za nastanak HCK-a.

Rani HCK je zloćudna novotvorina visokog stupnja diferenciranosti, teško prepoznatljiva makroskopski i mikroskopski. Rani HCK je veličine manje od 2 cm, dobro ograničen čvor, građen od malih stanica sličnim hepatocitima. U ranom HCK-u se može vidjeti povećana gustoća zloćudnih stanica, nepravilne trabekule, pseudožljezdane formacije, masna promjena i unutarnovotvorinski portalni prostori. Razlika između ranog HCK-a i displastičnih čvorova visokog stupnja diferencijacije nekad je teško uočljiva, međutim prisutan invazivan rast u okolno tkivo jetre govori u prilog HCK-a.

Prelazak hepatocelularnog adenoma u HCK je rijedak. Pojedina molekularna istraživanja su pokazala da neki adenomi imaju povećani rizik za prelazak u HCK i karakterizirani su mutacijama beta-katenina.

Imunohistokemijski zloćudne stanice HCK-a pokazuju citoplazmatsku izraženost HepPar1 u 90% slučajeva, a izraženost je slabija u slabije diferenciranom HCK-u. Učestalo pokazuje imunohistokemijsku izraženost alfafetoproteina (AFP), fibrinogena, i citokeratina 8 i 18 (4). Visoke vrijednosti serumskog AFP-a se mogu vidjeti u 2/3 velikih HCK-ova, manje novotvorine, veličine 2-3 cm obično nemaju povišene vrijednosti istog (12).

1.1.3 Etiologija i čimbenici rizika

Najčešći uzrok HCK-a su HBV i HCV (2, 4). Ostali, učestaliji rizični čimbenici u nastanku HCK-a su jetrena ciroza nastala zbog prekomjernog unošenja alkohola, hemokromatoze ili nedostatka alfa-1-antitripsina te nealkoholni steatohepatitis (NASH) (2-5, 13, 14).

Infekcija HBV-om je općenito najčešća virusna infekcija u ljudi (1). HBV pridonosi nastanku HCK-a u 50% slučajeva širom svijeta, a u 70-80% slučajeva u endemskim područjima. HBV genom sadržava površinski antigen (HBsAg), hepatitis B e antigen (HBeAg), hepatitis B jezgri antigen (HBcAg) te multifunkcionalni nestrukturalni protein hepatitis Bx antigen (HbxAg). Mutacije HBV-a su učestalije od mutacija nekih drugih virusa što ima za posljedicu veću virulenciju i otpornost na antivirusnu terapiju (5). Opisano je osam genotipova HBV-a koji pokazuju različitu zemljopisnu raspodjelu unutar i između različitih područja (1, 5). Genotip C HBV-a i njegove mutacije se povezuju sa većim rizikom nastanka HCK-a, što može poslužiti u ranom otkrivanju rizičnih bolesnika s HBV-om za nastanak HCK-a (5).

Učinak HBV-a na pojavu HCK-a je pojačan uz kroničan prekomjeren unos alkohola što je izraženo u Sjevernoj Americi i sjevernoj Europi, pretilost, šećernu bolest te izloženost aflatoksinu B1 (1, 4, 15). Uloga HBV-a u nastanku HCK-a se potvrđuje smanjenjem učestalosti nastanka HCK-a u nekim područjima svijeta nakon provođenja programa cijepljenja protiv HBV-a (4, 5, 16).

Oko 350 milijuna ljudi je kronično inficirano HCV virusom, a oko 40-60% inficiranih bolesnika će razviti kroničnu jetrenu bolest tijekom vremena (17). Infekcija HCV-om je učestalija u bolesnika s HCK-om u Europi, Japanu i Sjevernoj Americi. HCV ima standardni RNA genom koji pokazuje genetsku različitost. Postoji šest različitih genotipova i 52 subtipa, različite zemljopisne raspodjele, a za razliku od HBV-a zbog brzog umnožavanja i izrazite genetske različitosti ne postoji profilaktičko cjepivo protiv HCV-a (4). Različiti redoslijed aminokiselina različitih genotipova HCV-a uzrokuje različite mehanizme patoloških događanja vezanih uz ovaj virus (17, 18). HCV uzrokuje akutni i kronični hepatitis, a putem oksidativnog stresa, inzulinske rezistencije, fibroze, ciroze i steatoze vodi nastanku HCK-a (17-19). Jetrena steatoza je obilno nakupljanje lipida u hepatocitima koje se smatra važnim uzrokom ciroze, a jetrena steatoza u bolesnika sa HCV infekcijom je povezana sa brzim umnožavanjem virusa i progresijom fibroze (19). Izvanjski stresori, kao što je alkohol u kombinaciji sa HCV-om pojačavaju rizik nastanka ciroze (18, 20). Rizik nastanka HCK-a u ljudi sa cirozom uzrokovanom HCV-om je između 1 i 7%, a pojavljuje se 20-30 godina nakon infekcije uz prethodni razvoj ciroze (4).

Nealkoholna masna bolest jetre (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) je u dramatičnom porastu, a sastoji od jednostavne steatoze i nealkoholnog steatohepatitisa (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) (21). Prevalencija NAFLD-a je također u porastu u zapadnim zemljama i Japanu zbog porasta pretilosti i šećerne bolesti, a predstavlja jetrenu manifestaciju metaboličkog sindroma koji uključuje inzulinsku rezistenciju, pretilost, dislipidemiju, šećernu bolest i hipertenziju (22, 23). NAFLD se povezuje sa 2.7 % svih ciroza i uzrokuje 1.6 % svih HCK-ova te može direktno utjecati na hepatokarcinogenezu neovisno o cirozi (21, 24). Oko 20% slučajeva NASH-a prijeđe u cirozu, a u 10 % slučajeva može nastati i HCK (21, 22, 25). NASH kao kliničko-patološki entitet, histološki uključuje različita stanja, nekrozu, steatohepatitis, fibrozu, cirozu te ima obilježja alkoholne jetrene bolesti bez unosa alkohola ili tek male količine alkohola, uz odsutnost ostalih jetrenih bolesti (autoimuni hepatitis, lijekovima uzrokovana jetrena bolest, primarna bilijarna ciroza, primarni sklerozirajući kolangitis, Wilsonova bolest, hemokromatoza), odsutnost HBsAg i HCV RNA (21-23, 26). Bolesnici sa kriptogenom cirozom imaju klinička obilježja povezana s NASH-om, te je NASH prepoznat kao vodeći uzrok kriptogene ciroze, ali se dijagnoza NASH-a ne može potvrditi patohistološki (22, 23).

U Sjevernoj Americi i sjevernoj Europi prekomjerni unos alkohola je vodeći rizični faktor kronične jetrene bolesti i ciroze (3, 4). Pojava HCK-a je dva puta učestalija u muškaraca koji unose alkohol u velikim količinama, te u žena koje unose umjereno alkohol (4). Zajedno sa infekcijom HBV-om i HCV-om ima zajedničko djelovanje u nastanku HCK-a (3).

Aflatoxin B1, mogući je jetreni karcinogen, proizvod gljivice *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus flavus*, koji u Aziji i subsaharskoj Africi, gdje klimatski čimbenici pogoduju kontaminaciji hrane ovom gljivom, te uz HBV infekciju može doprinjeti nastanku HCK-a (3, 4).

Ostali čimbenici rizika u nastanku HCK-a su: prirođena hemokromatoza, nedostatak alfa-1-antitripsina, šećerna bolest, pretilosti te pušenje i to uglavnom u Americi, Europi, Kanadi i Australiji gdje se bilježi njihov porast (1, 3, 4). Velike stanične promjene jetrenih stanica ili displazija u kombinaciji sa HBV i HCV infekcijom su također rizičan faktor u nastanku HCK-a (4).

1.1.4 Molekularna patogeneza

Patogeneza HCK-a je povezana sa progresivnim gubitkom stanične diferencijacije, normalne stanične adhezije, razgradnje izvanstaničnog matriksa i trajne aktivacije signalnih putova važnih u staničnom rastu (16).

Molekularni mehanizmi koji imaju ulogu u nastanku HCK-a su heterogeni, pojavljuju se kao rani i kasni događaji u cirotičnom jetrenom tkivu i displastičnim čvorovima tijekom hepatokarcinogeneze (15, 16, 27, 28). Mutacije tumor supresora p53, retinoblastomskog (Rb) gena i inzulin-like growth factor 2 receptor 1 (IGF_{R1}) gena opisane su u HCK-u, dok su c-myc i cyclin D1 geni učestalo izraženi.

Rani događaji tijekom hepatokarcinogeneze su brojne molekularne promjene u cirotičnom tkivu jetre (16). Rani događaji povezani sa HBV infekcijom, su vezanje HBxAg na p53 i njegova inaktivacija. Također HBxAg indirektno povećava razinu alfa-fetoproteina, funkcionalno inaktivira Rb, te aktivira izraženost inzulinu sličnog faktora rasta 2 (*inzulin-like growth factor 2*, IGF2) u prezloćudnim čvorovima. Zatim stimulira stanični rast utječući na NFκ-B signani put, aktivira onkogene važne u staničnoj proliferaciji kao što je c-myc, koji također može biti aktiviran i mutacijama beta-katenina (3, 14-16, 28, 29). Osim toga, u HBV zloćudnim stanicama je smanjena razina proteina (npr. glutation peroksidaze) koji inaktiviraju kemijske karcinogene (16).

U bolesnika sa HCK-om uzrokovanim HCV-om, HCV jezgrin protein povećava razine c-myc-a, inaktivira p53, inhibira faktor tumorske nekroze (TNF-α), uzrokuje jetrenu steatozu i oštećenje DNA, te mutacije Bcl6 i beta-katenina (3, 16-19). Kombinacija steatoze i HCV infekcije, povezana je sa oksidativnim stresom i bržom progresijom fibroze (17-19, 22).

Mogući mehanizmi kojima NASH uzrokuje HCK-a, koji se javljaju također tijekom rane faze hepatokarcinogeneze, su inzulinska rezistencija sa hiperinzulinemijom, oksidativni stres, te upalni citokini. Inzulinska rezistencija uzrokuje inhibiciju jetrene mitohondrijalne oksidacije masnih kiselina, a nakupljanje masnih kiselina dovodi do oksidativnog oštećenja DNA (22). Pretilost i inzulinska rezistencija uzrokuju oslobađanje proupalnih citokina (TNF-alfa, IL-6) koji uzrokuju oštećenje jetre, upalu i fibrozu (21, 30).

Posljedice prekomjernog unosa alkohola imaju utjecaj u nastanku HCK-a u ranijem tijeku hepatokarcinogeneze. Jedan od mehanizama u kojima sudjeluje alkohol je lipidna peroksidacija acetaldehidom koja uzrokuje nakupljanje T limfocita čime nastaje kronično jetreno oštećenje i reaktivni kisikovi spojevi. Osim toga alkohol destabilizira stanične membrane i povećava ulazak karcinogena u stanice. U rane događaje se ubraja stvaranje

reaktivnih kisikovih spojeva (*reactive oxygen species*, ROS), koje proizvode mononuklearne upalne stanice tijekom upale i nekroze, uslijed utjecaja alkohola, HCV-a i HBV-a (3, 16).

U prezloćudnim ćvorovima, tijekom rane faze karcinogeneze opažene su promjene u izraženosti različitih gena povezanih sa hiper i hipometilacijom stanične DNA kao i gena povezanih sa staničnim ciklusom, što pridonosi kromosomskoj nestabilnosti, transkripcijskim i translacijskim promjenama (16). Također jedan od ranih događaja je mutacija beta-kenina, komponente Wnt signalnog puta, čije su ciljne mete c-myc, c-jun, cyclin D1 i matriks metaloproteinaze, koje posljedično imaju ulogu u nastanku fibroze i ciroze kao lezija koje prethode HCK-u (16, 28). Osim toga, p53 negativno regulira Wnt signalni put, a inaktivacija p53 uzrokovana HBxAg-om može povećati Wnt signalizaciju, dok poticanje izraženosti c-myc-a HCV jezgrinim proteinom može uzrokovati stabilizaciju i nakupljanje beta-kenina u jezgri.

Kemijski karcinogen, aflatoksin B1 (AFB) uzrokuje mutacije p53, a osobe sa mutiranim jednim ili oba enzima koji inhibiraju AFB su u većem riziku za nastanak HCK-a (16).

U 80% HCK-ova je pojačana aktivnost telomeraza i njihova reaktivacija u ranim fazama hepatokarcinogeneze pojačava prelazak displazije u zloćudnu novotvorinu (8, 15).

Kasni događaji tijekom hepatokarcinogeneze većinom uključuju gensku nestabilnost, te kromosomske promjene. Opisani su gubitak heterozigotnosti (*lost of heterosigoty*, LOH) kromosoma 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16q, 17p i gena važnih u DNA popravku tijekom zloćudne progresije HCK-a i metastaziranja, koje su povezane sa lošijim ishodom (16). Kronična infekcija HBV-om u kasnijim fazama hepatokarcinogeneze je povezana sa kromosomskom nestabilnošću, uključivanjem HBV DNA sekvence u genom hepatocita u blizini cyclina A, kojeg može aktivirati ili spriječiti djelovanje antionkogena (2, 3, 14, 16). U kasnije događaje spadaju mutacije APC gena, koje rezultiraju nakupljanju beta-kenina, a LOH 16p kromosoma uključenog u gubitak axin gena, koji normalno potiče razgradnju beta-kenina, ima za posljedicu nakupljanje beta-kenina u jezgri. S obzirom da je E-kaderin vezan na beta-kenin, mutacije E-kaderina su povezane sa njegovim nakupljanjem u jezgri i citoplazmi, a hipermetilacija E-kaderina uzrokuje aktivaciju Wnt signalnog puta (16). Mutacije p53 povezane sa slabije diferenciranim HCK-ovima, opisane su u 30-55% bolesnika s HCK-om, i mutacije Rb se javljaju kao kasniji događaji tijekom hepatokarcinogeneze (3, 16, 27, 28).

1.1.5 Klinički pristup i liječenje

Terapijski pristup u liječenju HCK-a može biti kurativni i i palijativni.

Kurativni postupci su resekcija, ortotopna transplantacija jetre (*orthotopic liver transplantation*, OLT) i perkutana ablacija kojima se postiže cjelovit odgovor u većem broju bolesnika. Palijativnim postupcima koje čine kemoembolizacija, kemoterapija, radioterapija, hormonalni pristup, imunoterapija, se ne postiže izlječenje, ali mogu u nekim slučajevima dati dobar odgovor.

Resekcija i OLT daju dobre rezultate u pažljivo odabranim skupinama bolesnika s 5 godišnjim preživljenjem od 60-70%. Resekcija se preporučuje za bolesnike sa HCK-om u ranom stadiju, male veličine i dobrom funkcijom jetre, održanim portalnim tlakom i razinom bilirubina (31-33). Većinu postupaka resekcije ne prate komplikacije. Transplantacija je najbolji izbor za bolesnike sa jednim tumorom i dekompenziranom cirozom ili za bolesnike sa više novotvorinskih žarišta male veličine (31). Kandidati za OLT imaju jedan HCK-a veličine do 5 cm, ili tri tumora, svaki veličine do 3 cm, bez klinički jasnih znakova žilne invazije, čime su definirani milanski kriteriji za transplantaciju jetre autora Mazzaferro V i sur (10, 11, 31, 32, 34-36). Pri tome OLT može potencijalno izliječiti tumor i cirozu u isto vrijeme (35). Bolesnici s HCK-om unutar milanskih kriterija imaju ukupno petogodišnje preživljenje 75%, a preživljenje bez pojave recidiva je 83% što se ne razlikuje od očekivanog preživljenja bolesnika bez HCK-a (11, 36). Milanski kriteriji su prihvaćeni od strane američke donorske mreže (*United Network for Organ Sharing*, UNOS) kao i od strane Eurotransplanta, organizacije za razmjenu organa kojoj pripada veliki dio europskih zemalja i Hrvatska. Cilj primjene ovih kriterija je postići dobar ishod kod bolesnika koji ispunjavaju, a izbjeći loš ishod kod onih koji ih nadmašuju (36). OLT je učinkovit ako bolesnici čekaju na postupak manje od 6 mjeseci (31).

S obzirom da je sve veći broj bolesnika koji zahtjevaju OLT, a broj dostupnih kadaveričnih donora mali, uveden je model stupnjevanja težine jetrene bolesti kojim se određuju prioriteta na transplantacijskoj listi - model za krajnji stadij jetrene bolesti (*model for end-stage liver disease score*, MELD) (35). Dok su bolesnici na transplantacijskoj listi, u većini centara to vrijeme je dulje od 1 godine, neki pristupi kao resekcija, perkutani pristupi etanol injekcijama, transarterijska kemoembolizacija (*transarterial chemoembolization*, TACE) i jetrena transplantacija sa živućeg donora (*living donor liver transplantation*, LDLT) mogu umanjiti isključivanje sa liste (31, 32, 35).

LDLT je najpovoljnija zamjena kadaveričnoj transplantaciji, pogodna za rane HCK-ove, te ako vrijeme čekanja na transplantacijskoj listi prelazi 7 mjeseci bez utjecaja na donorsku dostupnost za bolesnike na transplantacijskoj listi (31, 35). Ograničenost predstavlja složenost postupka s posljedicama na primatelja ali i utjecajem na smrtonost donora (35).

Za rane neresektabilne HCK-ove, može se primijeniti perkutani pristupi-alkohol injekcijama ili radiofrekventnom ablacijom (31, 33, 35). Perkutane etanol injekcije imaju dobar odgovor u 90-100% HCK-a veličine do 2 cm, u 70% novotvorina veličine do 3 cm i 50% u novotvorina veličine do 5 cm (31, 33). Radiofrekventna ablacija ima prednost primjene kod novotvorina većih od 3 cm (31).

Palijativni pristupi se primjenjuju u uznapredovalim stadijima HCK-a (31). Najučestalije se koristi arterijska embolizacija za neresektabilne HCK-e (31, 35). Opstrukcija hepatalne arterije dovodi do nastanka nekroze u velikim, dobro prokrvljenim HCK-a (31). Kandidati za kemoembolizaciju su bolesnici sa neresektabilnim novotvorinama, sa očuvanom funkcijom jetre, asimptomatičnim višežarišnim novotvorinama, bez prisutne žilne invazije ili ekstrahepatalnih metastaza (31, 33, 37).

Za bolesnike u uznapredovalim stadijima bolesti i neoperabilnim novotvorinama preporučuje se molekularno usmjerena terapija Sorafenib, koji utječe na proliferaciju zloćudnih stanica i angiogenezu sa uspješnim posljedicama na preživljenje bolesnika sa neresektabilnim HCK-om. Sorafenib se može koristiti i u bolesnika u ranom stadiju bolesti kao adjuvantna terapija (33). Bolesnici u terminalnom stadiju liječe se simptomatski (kemoterapija - doksorubicin, interferon alfa, antiestrogeni, analozi somatostatina) (31, 33, 38).

Prema dosadašnjim istraživanjima, postoji potreba za redefiniranjem i pronalaženjem najprihvatljivijih kriterija kojima se odabire bolesnike za transplantaciju među bolesnicima s HCK-om, smanjujući broj bolesnika koji bi neispunjavajući postojeće kriterije bili isključeni sa transplantacijske liste, te pronalaženje prihvatljivih terapijskih mjera prije OLT-a (39).

1.2 GLIPIKAN -3

Glipikan-3 (GPC3) je glikozilfosfatidil inozitol membranski protein, vezan na staničnu membranu, član obitelji heparan-sulfat proteoglikana (HSPGs), koji ima ulogu u staničnom rastu, diferencijaciji i migraciji, u regulaciji stanične proliferacije i apoptoze tijekom koštane morfogeneze, te u razvoju bubrežnog i neuralnog tkiva (40-43).

GPC3 u različitim tkivima, različitog biološkog okoliša ima ulogu u poticanju ili u zaštiti protiv karcinogeneze (42).

HSPGs su ekstracelularne molekule na površini stanica koje se sastoje od proteinske jezgre koju čine sindekan i glipikan na koje su vezane heparan sulfat glikozaminoglikanski lanci, koji sudjeluju u procesu organogeneze, embrionalnog razvoja, angiogeneze, regulaciji krvne koagulacije, staničnoj adheziji i lipidnom metabolizmu (44). HSPGs sudjeluju u različitim signalnim putevima: Wnt, TGFbeta, Hedgehog, put FGF2, koji mogu biti aberantno aktivirani u HCK-u (42, 44, 45). HSPGs utječu na raspodjelu *Wingless*-a (Wg), člana Wnt obitelji solubilnih glikoproteina važnih u procesu embriogeneze i karcinogeneze, koji se vežu na heparan sulfate, izraženi u različitim vrstama od *Drosophila* do čovjeka (44, 46-49).

Genetičke i epigenetičke promjene Wnt-beta katenin signalnih molekula prisutne su u humanoj hepatokarcinogenezi, a aktivacija Wnt signalnog puta koji stimulira staničnu proliferaciju jedan je od važnijih događanja (47, 48, 50). GPC3 jezgri protein može tvoriti spoj s Wnts molekulama uzrokujući aktivaciju Wnt/beta-katenin signalnog puta, koja vodi nakupljanju beta-katenina uz pojačanu izraženost gena koji potiču staničnu proliferaciju i rast stanica HCK-a (45, 48, 51-53). Izraženost GPC3 je značajno povezana s lokalizacijom beta-katenina u jezgri/citoplazmi stanica HCK-a (54-56). Mutacija GPC3 dovodi do pojačanog rasta intrauterino, a zamijećena je u Simpson-Golabi-Behmel sindromu (SGBS, X-vezanom poremećaju obilježenom pre- i posnatalnim prekomjernim rastom, koštanim i visceralnim distorfijama (51, 57-60). Prema novijim radovima smatra se da je SGBS posljedica gubitka kontrole GPC3 u Wnt signalnom putu (60).

GPC3 nije izražen u normalnom tkivu jetre, jetrenom adenomu (HA), fokalnoj nodularnoj hiperplaziji (FNH), dok je u malom postotku slučajeva ciroze zamijećena slaba izraženost kao i u cirotičnom tkivu uz HCK što može biti pokazatelj rane zloćudne transformacije od ciroze u HCK (41). Opisana je izraženost GPC3 u 70-100 % HCK-ova (u radu Coston WMP i sur (41) u 88 % slučajeva), melanomu, novotvorinama prostate, žumanjčane vreće, debelog crijeva, Wilmsovom tumoru, hepatoblastomu (40-43, 61-63). Neke humane novotvorine ne izražavaju

GPC3, kao što su novotvorine jajnika, dojke, pluća, jednjaka, mezoteliom, neke novotvorine probavnog sustava (41, 42). Uz imunohistokemijsku izraženost CD34, te AFP; GPC3 je koristan u razlikovanju HCK-a od benignih promjena jetre, a može biti izražen i u displastičnim čvorovima jetre (41, 64, 65). Do sada je opisan kao dijagnostički biljeg HCK-a u 26 studija (1, 41, 43, 52, 54, 63-82). Specifičnost GPC3 u HCK-u, opisana u jednoj studiji iznosi 97%, s imunohistokemijskom raspodjelom difuzno ili fokalno, slabog do jakog intenziteta (41). Zamijećena je učestalija membranska izraženost GPC3 u slabo diferenciranim, kao i u metastatskim HCK-ovima (81).

U četiri rada je izražena moguća prognostička vrijednost GPC3 kod bolesnika s HCK-om (81, 83-85). U radu Suzukija M i sur (81) izraženost GPC3 je analizirana u HCK-u dobrog, umjerenog i slabog stupnja diferencijacije i u metastatskim lezijama. Intenzitet izraženosti GPC3 u membrani i citoplazmi je podijeljen na 0 (negativna obojenost), umjerena (+) i jaka izraženost (2+), pri čemu je citoplazmatko obojenje bilo prisutno u svim slučajevima sa pozitivnom izraženošću GPC3. Membranska izraženost GPC3 je učestalije bila prisutna u slabije diferenciranim HCK-ima u usporedbi sa dobro diferenciranim kao i u metastatskim lezijama HCK-a u usporedbi sa primarnim HCK-ima (81). U radu Shirakawa H i sur (83) izraženost GPC3 je bila manje prisutna u dobro diferenciranim HCK-ima u usporedbi sa umjereno i slabo diferenciranim HCK-ima. U tom radu se pozitivnim rezultatom smatrala prisutnost GPC3 u >10% tumorskih stanica. HCK-i s pozitivnom izraženošću GPC3 povezani su sa značajno nižim petogodišnjim preživljenjem nego HCK-i s negativnom izraženošću GPC3 (83). U radu Yorita K i sur (84) opisuje se cirkumferentna membransku izraženost GPC3 kao pokazatelj lošije prognoze u bolesnika s HCK-om i HCV infekcijom. U radu Yu MC i sur (85) imunohistokemijska izraženost GPC3 je određena prema skali od -3 do +3. Pojačana izraženost GPC3 u malim HCK-a povezanim s HBV-om, veličine do 5 cm može biti nepovoljan znak nakon resekcije (85).

Serumska razina alfafetoproteina je koristan biljeg HCK-a, ali je dijagnostička specifičnost i osjetljivost GPC3 u krvi puno veća, poglavito u otkrivanju ranog HCK-a, ali i u praćenju bolesnika (43, 52, 82). U posljednje vrijeme se ispituje njegova primjena u liječenju HCK-a (61, 71, 81, 86, 87). Opisuje se monoklonalno protutijelo na COOH-terminalnu regiju GPC3 koje inducira protutijelima ovisnu citotoksičnost (*antibody-dependent cellular cytotoxicity* ADCC) što je mogući mehanizam protunovotvorinskog učinka GPC3 (88, 89).

Osim toga anti-GPC3 protutijelo može direktno inhibirati rast novotvorine, blokirajući međudjelovanje ligand-receptora uključenog u Wnt signalni put (52).

1.3 BETA - KATENIN

Beta-katenin je multifunkcionalni protein, u stanici smješten submembranski (90-92). Postoje tri tipa međudjelovanja koja su posredovana beta-kateninom (90, 91). Beta-katenin je važan u staničnoj adheziji, sudjeluje u kaderin-katenin adhezijskom sustavu i veže kaderin preko alfa katenina sa aktin citoskeletom kontrolirajući E-kaderin staničnu adheziju a čiji gubitak pridonosi novotvorinskoj progresiji brojnih novotvorina (90, 92, 93, 94). Vezanjem za transkripcijske faktore u jezgri sudjeluje u regulaciji genske izraženosti. Također slobodni beta-katenin sudjeluje u interakciji s aksinom i adenomatoznim polipoznim proteinom debelog crijeva (*adenomatous polyposis coli*, APC), tumor supresorom važnim u nastanku karcinoma debelog crijeva i moždanih metastaza (90, 91, 95).

U radovima rađenim na jetrama različite gestacijske dobi, ustanovljena je njegova izraženost u citoplazmi i jezgri ranog razvoja jetre, dok se u jetri odraslih nalazi membranski (98). U nekim radovima je opisana citoplazmatska izraženost beta-katenina slabog intenziteta normalnih hepatocita, a jakog intenziteta u citoplazmi ili jezgri HCK-a (97, 98). Neke novotvorine debelog crijeva (90%) i melanomi imaju mutaciju APC i povišenu razinu beta-katenina (99).

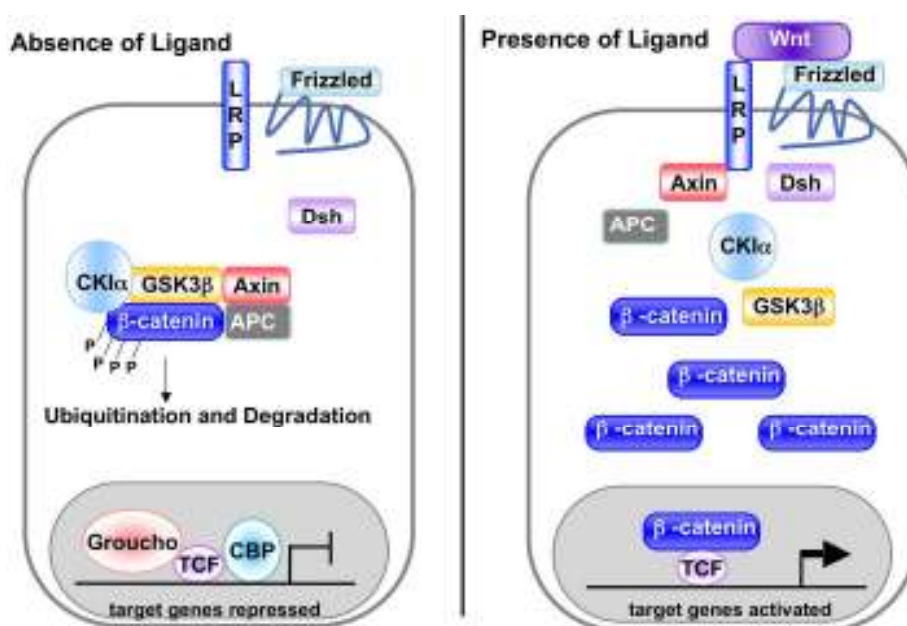
Beta-katenin je središnja molekula Wnt signalnog puta (slika 1), važnog u različitim razvojnim procesima, regulaciji stanične proliferacije, organogenezi, embriogenezi, a deregulacija ovog signalnog puta pridonosi nastanku zloćudne novotvorine (90, 100-102).

Wnt/beta-katenin signalni put sudjeluje u razvoju jetre, nastanku HCK-a (u najmanje 30% slučajeva), regulira diferencijaciju epitelnih stanica crijeva, kože, mišića i hematopoetskih stanica (103-105). Wnts su velika obitelj glikoproteina, izraženi u različitim vrstama od *Drozofila* do čovjeka (99). U normalnim uvjetima razina beta-katenina u citoplazmama stanica je niska. Promjene u Wnt signalnom putu kao i mutacije različitih komponenti ovog puta, mogu uzrokovati njegovu trajniju aktivaciju, čime ne dolazi do razgradnje beta-katenina, već se beta-katenin nakuplja u citoplazmi, prelazi u jezgru i aktivira gensku transkripciju (49, 103).

Kada je Wnt signalni put aktiviran, vezanjem Wnt na *Frizzled* receptore, signal se prenosi preko *dishevelled* (dsh) proteina koji inaktivira *glycogen synthase kinase* (GSK) (90, 101). Posljedica inaktivacije je hipofosforilacija beta-katenina, APC i Aksina, pri čemu se beta-katenin oslobađa iz kompleksa s APC i Aksinom, smanjuje se razgradnja beta-katenina, nakuplja u citoplazmi i odlazi u jezgru (90, 101, 103, 99). U jezgri se beta-katenin povezuje s transkripcijskim faktorima: limfoidnim pojačavajućim faktorom vezanja (*lymphoid enhancer*

factor, LEF)/T staničnim specifičnim faktorom (*T cell-specific factor*, TCF) i zajedno aktiviraju gene *c-myc*, *cyclin-A*, *E*, *D1*, *B1*, *C* uključene u progresiju staničnog ciklusa, zatim gene odgovorne za antiapoptozu, invaziju - matriksmetaloproteinaze (MMP) i angiogenezu - *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (90, 91, 97, 100, 106-109).

U slučaju izostanka aktivacije Wnt signalnog puta GSK fosforilira beta-katenin, te uz APC i Aksin usmjerava beta-katenin razgradnji sa ubikvitin-proteosomnim sistemom te tako održava nisku razinu beta-katenina u citoplazmi stanice (90, 101, 103).



Slika 1. Wnt signalni put.

Izvor: Eisenmann, DM. Wnt signaling. U: Greenwald I ur. WormBook, The C. elegans Research Community <http://www.wormbook.org>, 2005, str. 3

Beta-katenin se može ponašati kao onkogen te se u posljednje vrijeme istražuje sve više molekula koje bi djelovale na beta-katenin i Wnt signalni put kao potencijalni faktori u liječenju HCK-a i njihov protunovotvorinski učinak (90, 104, 105, 110-113). Ispitivana je uloga *dickkopfsova* (DKKs) sekretornih glikoproteina koji imaju sposobnost inhibiranja Wnt/beta-katenin signalnog puta (105). U radu Ishizaki Y i sur (114) imunohistokemijski je u 27% HCK-a dokazana nuklearna izraženost beta-katenina, što je posljedica mutacija beta-

katzenina prisutnih u 41.7% slučajeva pozitivnih uzoraka HCK-a. Mutacije beta-katenina su povezane s njegovim nakupljanjem u jezgri (105). Bolesnici s izraženim mutiranim oblikom beta-katenina i nuklearnim nakupljanjem imaju bolje petogodišnje preživljenje nego bolesnici s nuklearnim nakupljanjem divljeg tipa beta-katenina (105, 115). U literaturi je opisana membranska izraženost beta-katenina, povezana s lošijim ishodom bolesnika (116). Mutacije Wnt/beta-katenin signalnog puta prisutne su u brojnim drugim novotvorinama: kolangiocelularnoj novotvorini, melanomu, novotvorinama želuca, debelog crijeva, dojke i mozga (103, 117, 94). Nuklearna izraženost beta-katenina je povezana s HBs-Ag statusom i histološkim stupnjem diferenciranosti HCK-a, a HBx virusni regulatorni protein je uključen u aktivaciju Wnt/beta-katenin signalnog puta (118, 119). U radu Akutsu i sur (54) izraženost beta-katenina u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica je zapažena uz značajniju izraženost GPC3, čime bi GPC3 mogao imati ulogu u nuklearnoj/citoplazmatskoj lokalizaciji beta-katenina u HCK-u.

1.4 CD34

CD34 je glikolizirani transmembranski protein, normalno izražen u endotelnim stanicama krvnih žila i osjetljiv biljeg novotvorinske angiogeneze (41).

U normalnom jetrenom tkivu endotelne stanice sinusoida rijetko proliferiraju u fiziološkim uvjetima osim ako nisu stimulirane (9). Neoangiogeneza je važan proces u novotvorinskom metastaziranju i rastu. Angiogeneza uključuje stvaranje novih krvnih žila iz postojećih kapilara, dok je hepatalna angiogeneza karakterizirana kapilarizacijom sinusoida u novotvorinskom tkivu (41). Angiogeneza se pojačava u alkoholnoj jetrenoj bolesti, HBV infekciji, makronodularnoj cirozi (9, 120). U radovima se opisuje postepen porast CD34 pozitivnih sinusoida u cirotičnom jetrenom tkivu, HA, FNH i displastičnim čvorovima, dok je difuzna, sinusoidalna raspodjela izraženosti CD34 opisana u HCK-u. Potpuna izraženost jakog do umjerenog intenziteta zapažena je u sinusoidama HCK-a, u FNH i HA je zapažena nepotpuna izraženost, dok je izraženost negativna u cirotičnoj jetri (9, 41, 121-123).

Uz GPC3, CD34 je također važan biljeg HCK-a, a njegova izraženost je povezana s žilnom invazijom, histološkim stupnjem diferenciranosti tumora i ishodom bolesnika s HCK-om (41, 122). Opisana je razlika u izraženosti CD34 u dobro i umjereno diferenciranom HCK-u (9). Novotvorinska žilna gustoća, prikazana imunohistokemijski s CD34 u HCK-ima manjim od 5 cm, može biti pokazatelj ranog ponovnog pojavljivanja novotvorine nakon resekcije, pri čemu protuangiogena terapija može imati koristi u HCK-ima manje veličine (124).

2. HIPOTEZA

Pozitivna membranska izraženost GPC3 jakog intenziteta, uz nuklearnu izraženost beta-katenina i jaku sinusoidalnu izraženost CD34 izdvojiti će u skupini tumora unutar milanskih kriterija bolesnike s kraćim preživljenjem nakon transplantacije jetre. U bolesnika koji su izvan milanskih kriterija, izostanak membranske izraženosti GPC3, intranuklearne izraženosti beta-katenina te slaba sinusoidalna izraženost CD34 izdvojiti će skupinu bolesnika s duljim preživljenjem nakon transplantacije.

3. CILJEVI RADA

1. Odrediti morfološke karakteristike HCK-a: broj, veličina tumora, histološki tip, arhitekturni tip rasta, stupanj diferencijacije, prisutnost žilne invazije i metastaza.
2. Analizirati karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet GPC3, beta-katenina i CD34 u HCK-u i u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom.
3. Usporediti morfološke karakteristike i karakteristike izraženosti ispitivanih biljega u HCK-u bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija.
4. Rezultate morfološke analize i karakteristike izraženosti ispitivanih biljega usporediti s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima: dob, spol, uzrok ciroze, serumski alfa-fetoprotein, protrombinsko vrijeme, ukupni bilirubin, kreatinin, ponovna pojava tumora i ukupno preživljenje.
5. Odrediti utjecaj morfoloških karakteristika, karakteristika izraženosti ispitivanih biljega, kliničkih i laboratorijskih pokazatelja na ishod bolesnika s HCK-om unutar i izvan milanskih kriterija.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ispitanici

U istraživanje je uključen 71 bolesnik s HCK-om, dijagnosticiran i liječen transplantacijom jetre u KB Merkur u razdoblju od 2002. do 2011. godine.

Identitet bolesnika uključenih u istraživanje zaštićen je korištenjem broja protokola biopsije za identifikaciju. Klinički i laboratorijski podaci dobiveni su iz osobnih kartona bolesnika Klinike za unutarnje bolesti KB Merkur. Prikupljeni podaci prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika

Dob	raspon / medijan godine	24 – 75
Spol	m / ž	55 (77.46%) / 16 (22.53%)
Praćenje	raspon / medijan dani	2 – 2065 / 588
Ishod	umrli / živi	18 (25.35%) / 53 (74.64%)
Uzroci ciroze	alkohol	30 (42.25%)
	HCV	22 (30.98%)
	HBV	8 (11.26%)
	kriptogena	5 (7.04%)
	PBC	2 (2.81%)
	nedostupan podatak	3 (4.22%)
Bez ciroze		1 (1.40%)
alfa-fetoprotein	N [*] / ↑ ^{**}	28 (43.75%) / 36 (56.25%)
Kreatinin	N / ↑	61 (88.41%) / 8 (11.59%)
PV ^{***}	N / ↑	68 (100%) / 0
Bilirubin	N / ↑	6 (8.70%) / 63 (91.30%)

* N - normalna vrijednost; ** ↑ - povišena vrijednost; *** PV - protrombinsko vrijeme

U ispitivanoj skupini bilo je 55 (77.46%) muškaraca i 16 (22.53%) žena. Medijan dobi bolesnika bio je 60.4 godina, a raspon 24-75 godina. Medijan praćenja iznosio je 588.47 dana, raspon 2-2065 dana. Tijekom navedenog razdoblja praćenja 18 bolesnika (25.35%) je umrlo, a 53 bolesnika (74.64%) su bili živi. S obzirom na uzrok ciroze 30 bolesnika (42.25%) je

imalo alkoholnu cirozu, 22 bolesnika (30.98%) je imalo cirozu uzrokovanu HCV-om, 8 bolesnika (11.26%) je imalo cirozu uzrokovanu HBV-om, 5 bolesnika (7.04%) cirozu nepoznatog uzroka (kriptogena ciroza), 2 bolesnika (2.81%) je imalo primarnu bilijarnu cirozu, te za 3 bolesnika (4.22%) podatak o uzroku ciroze nije bio dostupan. Jedan bolesnik (1.40%) nije imao cirozu u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom.

Analizirajući uzroke ciroze uočena je statistički značajna razlika s obzirom na spol bolesnika ($\chi^2 = 18.00$; s.s.= 5; **P = 0.003**) (Tablica 2.). U muškaraca ciroza je bila najčešće uzrokovana alkoholom, a zatim HCV i na trećem mjestu po učestalosti HBV. U žena najčešći uzrok ciroze je HCV, zatim jednakom učestalosti slijede alkohol i primarna bilijarna ciroza, te na trećem mjestu HBV.

Tablica 2. Usporedba uzroka ciroze i spola bolesnika

	Uzroci ciroze					Σ
	1	2	3	4	5	
Spol m	28	4	12	7	0	51
ž	2	1	10	1	2	16
Σ	30	5	22	8	2	67

$\chi^2 = 18.00$; s.s.= 5; **P = 0.003**

1 alkohol; 2 kriptogena; 3 HCV; 4 HBV; 5 primarna bilijarna ciroza

4.2 METODE

4.2.1 Morfološka analiza

Morfološka analiza uzoraka ispitivanih bolesnika obuhvaća makroskopsku i mikroskopsku morfološku analizu.

Makroskopski je određen točan broj i veličina tumora nakon rezanja presađene jetre na serijske rezove debljine do 0.4 cm. Također su pregledane krvne žile u hilusu jetre, dio gornje šuplje vene i na prerezima veći ogranci krvnih žila zbog mogućeg nalaza makroskopske krvožilne invazije tumora.

Mikroskopska analiza uzoraka s HCK-om i tkiva jetre nezahvaćenog tumorom, izvršena je na arhiviranom materijalu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur.

Materijal je obrađen standardnim postupkom za dobivanje patohistoloških preparata koji uključuje fiksaciju tkiva u 10% pufiriranom formalinu, uklapanje u parafinske kocke, rezanje rezova debljine 4 μ m, deparafiniranje i bojanje standardnom metodom hemalaun eozin (H&E), Gomori reakcijom srebrom za prikaz retikulina, Masson metodom za prikaz kolagena i metodom Berlinskog modrila za prikaz željeza.

Analizirane su slijedeće mikroskopske morfološke karakteristike: histološki tip, arhitekturni tip rasta, stupanj diferencijacije tumora, prisutnost mikrožilne invazije i metastaza, na histološkim rezovima obojenim H&E, prema kriterijima Klasifikacije SZO iz 2009. godine. S obzirom na histološki tip razlikuju se klasični i specifični tipovi tumora, te s obzirom na prevladavajući arhitekturni tip rasta trabekularan, acinarnan, solidan i miješani tip koji uključuje prisutnost trabekularnog i acinarnog rasta. Prema stupnju diferencijacije tumora razlikuju se dobro, umjereno i slabo diferencirani tumori.

4.2.2 Izrada tkivnog *microarray* (*tissue microarray*, TMA)

Na histološkim rezovima obojenim H&E odabrana su reprezentativna područja tumora bez nekroze i veziva te tkiva nezahvaćenog tumorom. Odabrana područja zatim su obilježena na odgovarajućim parafinskim kockama. Za izradu TMA korišten je komercijalni set za izradu *Tissue-Tek Quick-Ray System* (*Sakura, Netherlands*). Iz obilježenih područja na parafinskim kockama uzeta su kod svakog bolesnika dva cilindra tkiva tumora, te jedan cilindar tkiva nezahvaćenog tumorom, svaki promjera 3 mm. Navedeni cilindri tkiva preneseni su točno određenim redosljedom u novi parafinski blok *Tissue-Tek Quick-Ray Recipient Block* (*Sakura, Netherlands*), koji je zatim rezan na rezove debljine 4 µm. Dobiveni rezovi nakon deparafiniranja, obojani su standardnom metodom H&E kako bi se pod mikroskopom provjerila očuvanost tkiva i adekvatnost za imunohistokemijsko bojanje i analizu (80).

4.2.3 Imunohistokemijsko bojanje i analiza

Na rezovima TMA rađeno je imunohistokemijsko bojanje i analiza karakteristika izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet ispitivanih biljega GPC3, beta-*katena*ina i CD34.

U istraživanju su upotrebljena slijedeća primarna protutijela: GPC3 (*Cell Marque Corporation, North America*, monoklonalno, klon 1G12, razrijeđenje 1:50), beta-*katena*in (*DakoCytomation, Denmark*, monoklonalno, klon β-*katena*in-1, razrijeđenje 1:200) i CD34 (*DakoCytomation, Denmark*, monoklonalno, klon QBEnd 10, unaprijed razrijeđeno za upotrebu).

Rezovi TMA su deparafinirani te antigeni GPC3, beta-*katena*in i CD34 demaskirani u PT-modulu (*DakoCytomation, Denmark*) na 97°C, 20 minuta u puferu iz EnVision flex komercijalnog „3 u 1“ seta (*DakoCytomation, Denmark*, K8010) i obrađeni standardnim automatiziranim postupkom u Autostainer + aparatu (*DakoCytomation, Denmark*) te kontrastirani hematoxylinom.

Rezovi HCK-a s poznatom pozitivnom izraženosti navedenih biljega su korišteni kao pozitivna kontrola za navedene ispitivane biljege (63). Kao negativna kontrola su korišteni rezovi tkiva jetre bez tumora.

Karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet ispitivanih biljega analizirane su na slijedeći način.

Rezultati pozitiviteta izraženosti GPC3 klasificirani su prema postotku stanica s prisutnim obojenjem kako slijedi: negativni (<10%), slabo pozitivni (10-30%) i pozitivni (>30%) (67). Analiza je izvršena na najmanje 5 vidnih polja velikog povećanja 400x (VVP), ukupno na najmanje 1000 tumorskih stanica. Analizirana je prisutnost citoplazmatske, membranske ili miješane citoplazmatske/membranske izraženosti (66). Određen je intenzitet GPC3 bojanja: 0 - negativno, 1+ - slabo, vidljivo na povećanju 400x; 2+ - srednje, vidljivo na povećanju 100x i 3+ - jako, vidljivo na povećanju 40x.

Pozitivnim rezultatom izraženosti beta-katenina smatrana je prisutnost obojenja u >5% tumorskih stanica (118). Analiza je izvršena na najmanje 5 vidnih polja velikog povećanja 400x (VVP), ukupno na najmanje 1000 tumorskih stanica. Analizirana je prisutnost membranske, citoplazmatske i nuklearne izraženosti (114, 118). Određen je intenzitet beta-katenin bojanja: 0-negativno; 1+ - slabo, vidljivo na povećanju 400x, 2+ - srednje, vidljivo na povećanju 100x i 3+ - jako, vidljivo na povećanju 40x.

Pozitivnim rezultatom izraženosti CD34 smatrana je prisutnost točkaste, polukružne ili kružne obojenosti u endotelnim stanicama sinusoida (9). Analiza je izvršena na 10 vidnih polja velikog povećanja 400x (VVP), a rezultati su prikazani kako slijedi: 0 - negativno, 1+ - slabo, <25% obojenih endotelnih stanica, 2+ - srednje, 25-50% obojenih endotelnih stanica, 3+ - srednje jako, >50%-75% obojenih endotelnih stanica i 4+ - jako, >75% obojenih endotelnih stanica (9).

4.2.4 Statistička analiza

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Povezanost između kvalitativnih pokazatelja ispitana je χ^2 testom. Preživljenje je procijenjeno Kaplan-Meierovom analizom (107). Ukupno preživljenje je računato kao vrijeme praćenja od postavljanja patohistološke dijagnoze do dana smrti ili zadnje kontrole. Bolesnici koji su bili živi u vrijeme zadnje kontrole uključeni su kao cenzorirano praćeni u analizu ukupnog preživljenja. Za statističku analizu podataka korišten je program STATISTICA (version 7.0 StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Statističkim značajnim smatrali smo vrijednosti $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1 Morfološke karakteristike HCK-a

U svih 71 bolesnika analizirane su makroskopske i mikroskopske morfološke karakteristike HCK-a: broj, veličina tumora, histološki tip, arhitekturni tip rasta, stupanj diferencijacije, prisutnost žilne invazije i metastaza. U tablici 3. prikazane su karakteristike broja, veličine tumora, prevladavajući arhitekturni tip rasta i stupanj diferencijacije HCK-a.

Tablica 3. Morfološke karakteristike HCK-a

broj tumora	veličina tumora	arhitekturni tip rasta	stupanj diferencijacije
1	26 (36.62%)	≤3 cm 37 (52.11%) trabekularan 42 (59.15%)	dobro 12 (16.90%)
2-3	32 (45.07%)	>3-5cm 27 (38.02%) acinaran 3 (4.22%)	umjereno 52 (73.23%)
>3	13 (18.30%)	>5 cm 7 (9.86%) solidan 4 (5.63%)	slabo 7 (9.85%)
		miješani 22 (30.98%)	

S obzirom na broj tumora razlikovali smo bolesnike s jednim tumorom, bolesnike s dva i tri tumora, te bolesnike s više od tri tumora. Kod 26 (36.62%) bolesnika nađen je samo jedan tumor, 32 (45.07%) bolesnika imali su dva i tri tumora, dok je 13 (18.30%) bolesnika imalo više od tri tumora.

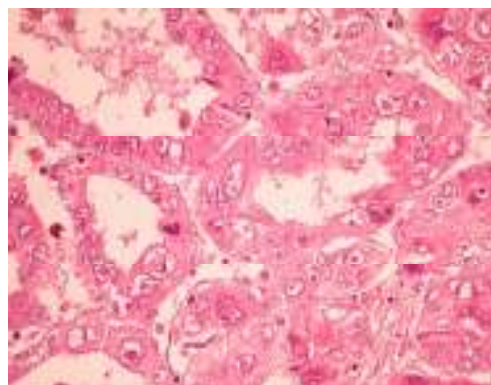
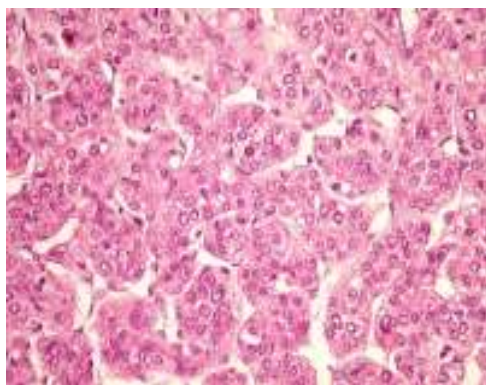
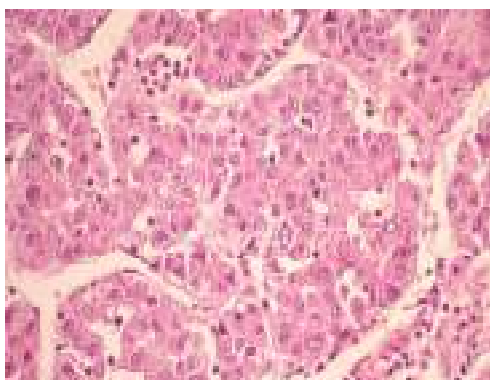
U analiziranoj skupini bolesnika izmjerene veličine tumora bile su 0.3 do 20 cm. Bolesnici su s obzirom na izmjerenu veličinu tumora podijeljeni u tri skupine. Skupina u kojoj je veličina pojedinog tumora manja ili jednaka 3 cm, skupina u kojoj veličina pojedinog tumora je veća od 3 do 5 cm, te skupina u kojoj su pojedinačni tumori veći od 5 cm. Najviše bolesnika, 37

(52.11%) imali su tumore ≤ 3 cm, 27 (38.02%) bolesnika imali su tumore veličine 3-5 cm i 7 (9.86%) bolesnika imali su tumore >5 cm.

Najčešće zastupljeni tipovi rasta tumora su trabekularan tip prisutan u 42 (59.19%) i miješani tip prisutan u 22 (30.98%) analizirana HCK-a. Acinarni tip rasta prisutan je u 3 (4.22%) analizirana HCK-a, a solidan tip rasta u 4 (5.63%) tumora.

Prevladavajući stupanj diferencijacije analiziranih tumora je umjereni stupanj prisutan u 52 (73.23%) tumora, 12 (16.90%) tumora su bili dobro diferencirani, a 7 (9.85%) analiziranih HCK-a slabo diferencirani.

Svi analizirani slučajevi HCK-a imali su histološke karakteristike klasičnog HCK-a, građeni od atipičnih epitelnih stanica izgleda hepatocita i strome koju čine žilni prostori nalik sinusoidama obloženi jednorednim endotelnim stanicama.



Slika 2. Hepatocelularni karcinom, H&E.

Makroskopski vidljiva žilna invazija u venu porte i veće krvožilne ogranke bila je prisutna kod 6 (8.45%) analiziranih HCK-a, dok je mikroskopski zamjećena mikrožilna invazija kod još 8 (11.26%) analiziranih HCK-a u kojima nije bila prisutna makrožilna invazija tumora. Ukupno 14 (19.72%) bolesnika imali su prisutnu žilnu invaziju koja je uključivala prisutnost makrožilne i mikrožilne invazije tumora.

Udaljene metastaze bile su prisutne samo kod jednog bolesnika.

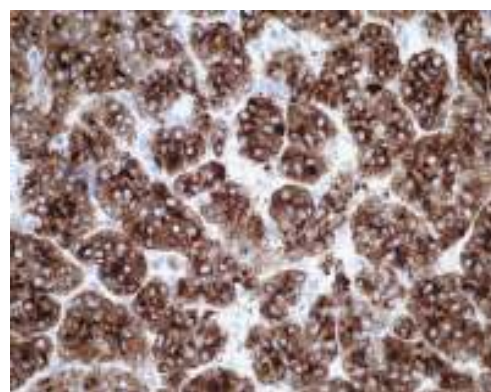
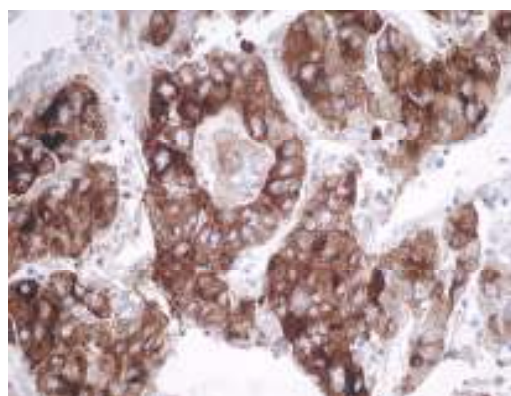
5.2 Karakteristike izraženosti GPC3, beta-katenina i CD34 u HCK-u i u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom

5.2.1 Karakteristike izraženosti GPC3 u HCK-u i tkivu jetre nezahvaćenom tumorom

Imunohistokemijske karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet GPC3 analizirane su u uzorcima tumora i tkiva jetre nezahvaćenom tumorom svih 71 bolesnika. U tkivu jetre nezahvaćenom tumorom niti u jednom uzorku nije bilo prisutno obojenje stanica, te su svi uzorci bili negativni. Karakteristike izraženosti GPC3 u HCK-u prikazane su u Tablici 4. Rezultati pozitiviteta izraženosti GPC3 klasificirani su prema postotku tumorskih stanica s prisutnim obojenjem. Uzorci s prisutnim obojenjem u <10% stanica smatrani su negativnim i takvih je bilo 23 (32.99%). Pozitivnih uzoraka s prisutnim obojenjem u >10% stanica bilo je 48 (67.60%). Izraženost GPC3 bila je pretežno u citoplazmama stanica u 68 (95.77%) uzoraka, a membranska izraženost bila je prisutna u 3 (4.22%) uzorka. 48 bolesnika s pozitivnom izraženosti GPC3 imalo je srednji 2+ intenzitet izraženosti u 9 (18.75%) uzoraka i jaki 3+ intenzitet u 39 (81.25%) uzoraka. U skupini bolesnika s negativnom izraženošću GPC3 u <10% stanica, uz 16 uzoraka u kojima nije bilo prisutno nikakvo obojenje, jedan uzorak je imao slabi 1+ intenzitet izraženosti, dok je pet uzoraka imalo srednji 2+ intenzitet i jedan uzorak jaki 3+ intenzitet izraženosti.

Tablica 4. Karakteristike izraženosti GPC3 u HCK-u

GPC3						
pozitivitet		lokalizacija		intenzitet		
<10%	23 (32.99%)	citoplazma	68 (95.77%)	negativan 0	16 (22.54%)	
>10%	48 (67.60%)	membrana	3 (4.22%)	slab 1+	1 (1.40%)	
				srednji 2+	14 (19.72%)	
				jak 3+	40 (56.33%)	



Slika 3. Pozitivna izraženost GPC3 u HCK-u.



Slika 4. Negativna izraženost GPC3 u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom.

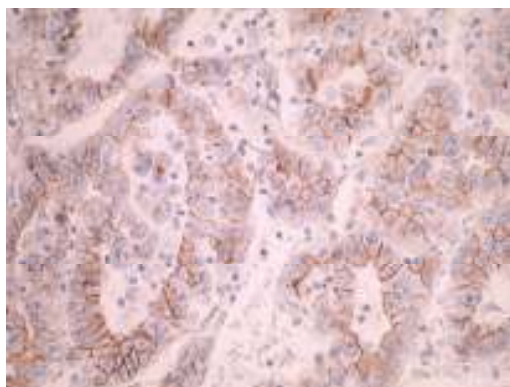
Usporedbe morfoloških karakteristika HCK-a – broja, veličine tumora, histološkog tipa, arhitekturnog tipa rasta, stupnja diferencijacije tumora, prisutne žilne invazije i metastaza sa karakteristikama izraženosti GPC3, nisu se pokazale statistički značajnima.

5.2.2 Karakteristike izraženosti beta-keninina u HCK-u i tkivu jetre nezahvaćenom tumorom

Imunohistokemijski pozitivan rezultat izraženosti beta-keninina s prisutnim obojenjem u >5% stanica bio je prisutan u svih 71 analiziranih uzoraka tumora i tkiva jetre nezahvaćenog tumorom. U svim uzorcima tkiva jetre nezahvaćenog tumorom i 70 (98.59%) uzoraka tumora bila je prisutna membranska izraženost beta-keninina, dok je u jednom uzorku tumora nađena citoplazmatska izraženost. S obzirom na intenzitet izraženosti u tumoru slab 1+ intenzitet prisutan je u 2 (2.81%), srednji 2+ intenzitet u 12 (16.90%) i jaki 3+ intenzitet u 57 (80.28%) uzoraka. U tkivu jetre nezahvaćenom tumorom u 3 (4.23%) uzoraka bio je prisutan slab 1+ intenzitet, u 34 (47.88) srednji 2+ intenzitet i u 34 (47.88%) jaki 3+ intenzitet beta-keninina. Karakteristike izraženosti beta-keninina prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. Karakteristike izraženosti beta-keninina u HCK-u i tkivu jetre nezahvaćenom tumorom

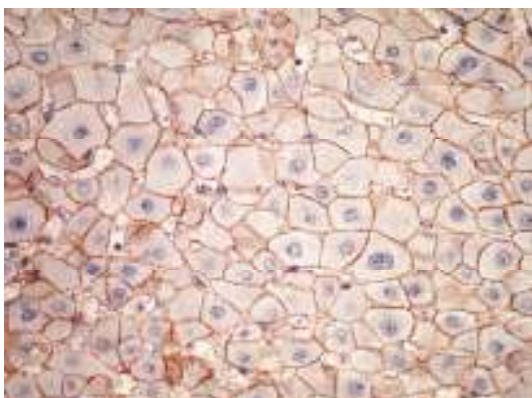
beta-kenin										
pozitivitet			lokalizacija				intenzitet			
HCK		jetra	HCK		jetra	HCK		jetra		
>5%	71(100%)	71(100%)	citoplazma	1 (1.40%)	0	negativan	0	0	0	
			membrana	70 (98.59%)	71(100%)	slab	1+	2 (2.81%)	3 (4.23%)	
						srednji	2+	12 (16.90%)	34 (47.88%)	
						jak	3+	57 (80.28%)	34 (47.88%)	



Slika 5. Pozitivna, membranska izraženost beta-keninina slabog (1+) intenziteta u HCK-u.



Slika 6. Pozitivna, membranska izraženost beta-keninina jakog (3+) intenziteta u HCK-u.



Slika 7. Pozitivna, membranska izraženost beta-kačenina jaki (3+) intenzitet u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom.

Usporedbe ostalih morfoloških karakteristika HCK-a – broja, veličine tumora, histološkog tipa, stupnja diferencijacije tumora, prisutne žilne invazije i metastaza sa karakteristikama izraženosti beta-kačenina, nisu se pokazale statistički značajnima.

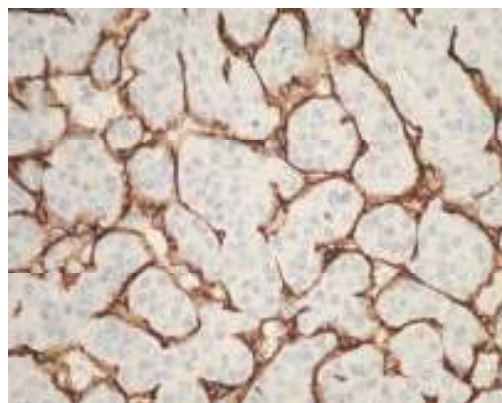
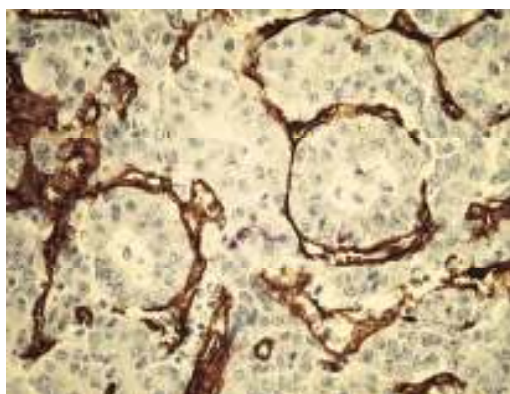
5.2.3 Karakteristike izraženosti CD34 u HCK-u i tkivu jetre nezahvaćenom tumorom

Jaka pozitivna izraženost CD34 s prisutnom točkastom, polukružnom ili kružnom obojenosti u endotelnim stanicama sinusoida bila je prisutna u 65 (91.54%) bolesnika, srednje jaka pozitivna izraženost CD34 bila je prisutna u 4 (5.63%) bolesnika, a srednja pozitivna izraženost je nađena u 1 (1.40%) bolesnika. Slabo CD34 pozitivno obojenih endotelnih stanica sinusoida je bilo kod 1 (1.40%) bolesnika, dok neobojenost endotelnih stanica s CD34 nije nađena u niti jednog bolesnika s HCK-om.

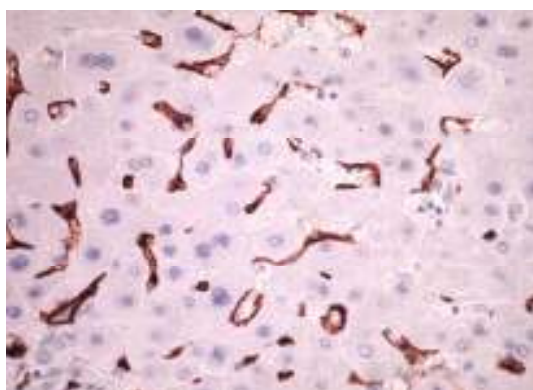
S obzirom na karakteristike izraženosti CD34 u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom, nije bilo bolesnika sa neobojanošću endotelnih stanica sinusoida sa CD34. U 64 (90.14%) bolesnika je bila prisutna slaba pozitivnost CD34, u 4 (5.63%) bolesnika je bila prisutna srednja pozitivna izraženost CD34, a srednje jaka pozitivna izraženost je nađena u 1 (1.40%) bolesnika, dok je jaka pozitivna izraženost CD34 bila prisutna u 2 (2.81%) bolesnika. Karakteristike izraženosti CD34 u HCK i tkivu jetre nezahvaćenom tumorom prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Karakteristike izraženosti pozitiviteta CD34 u HCK-u i tkivu jetre nezahvaćenom tumorom

CD34 pozitivitet					
HCK			jetra		
negativno	0	0	negativno	0	0
slabo	1+	1 (1.40%)	slabo	1+	64 (90.14%)
srednje	2+	1 (1.40%)	srednje	2+	4 (5.63%)
srednje jako	3+	4 (5.63%)	srednje jako	3+	1 (1.40%)
jako	4+	65 (91.54%)	jako	4+	2 (2.81%)



Slika 8. Pozitivna jaka 4+ izraženost CD34 u HCK-u.



Slika 9. Pozitivna slaba 1+ izraženost CD34, u tkivu jetre nezahvaćenom tumorom.

Usporedbe morfoloških karakteristika HCK-a, - broja, veličine tumora, histološkog tipa, arhitekturnog tipa rasta, stupnja diferencijacije tumora, prisutne žilne invazije i metastaza sa karakteristikama izraženosti CD34 u HCK-u, nisu se pokazale statistički značajnima.

5.3 Usporedba morfoloških karakteristika i karakteristika izraženosti GPC3, beta-katenina i CD34 u HCK-u bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija

Nakon utvrđivanja točnog broja i veličine tumora, te prisutnosti krvožilne invazije koja uključuje prisutnost makrožilne invazije i mikrožilne invazije, bolesnici su nakon transplantacije klasificirani u one unutar i izvan milanskih kriterija. Bilo je 30 (42.25%) bolesnika unutar milanskih kriterija i 41 (57.75%) bolesnik izvan milanskih kriterija.

Analizirajući broj tumora uočena je statistički značajna razlika s obzirom na bolesnike koji su unutar i izvan milanskih kriterija ($\chi^2 = 9.76$; s.s. = 2; **P = 0.008**). Bolesnici koji su unutar milanskih kriterija, njih 19 imali su jedan tumor, dok je 11 bolesnika imalo 1-3 tumora, ali niti jedan bolesnik nije imao više od tri tumora. Oni bolesnici koji su bili izvan milanskih kriterija, njih 7 su imali jedan tumor, većina, njih 21 su imali 2-3 tumora, a 13 bolesnika je imao više od tri tumora. Karakteristike usporedbe broja tumora sa milanskim kriterijima prikazane su u Tablici 7.

Tablica 7. Usporedba broja HCK-a i milanskih kriterija

		Broj tumora				
		**	1	2	3	Σ
Milanski kriteriji	*	1	19	11	0	30
		2	7	21	13	41
Σ			26	32	13	71

$\chi^2 = 9.76$; s.s.= 2; **P = 0.008**

**1 unutar milanskih kriterija; 2 izvan milanskih kriterija

*1 1 tumor; 2 2-3 tumora; 3 >3 tumora

S obzirom na veličinu tumora zamijećena je statistički značajna razlika između bolesnika s HCK-om koji su unutar i izvan milanskih kriterija ($\chi^2 = 37.83$; s.s. = 2; **P = 0.000**). 23 bolesnika koji su bili unutar milanskih kriterija imali su tumore veličine ≤ 3 cm, dok je 14 bolesnika izvan milanskih kriterija također imalo tumor veličine ≤ 3 cm. Zatim 7 bolesnika unutar milanskih kriterija i 20 bolesnika izvan milanskih kriterija imali su tumore veličine $> 3-5$ cm, a 7 bolesnika izvan milanskih kriterija je imalo tumore veće od 5 cm. Karakteristike usporedbe veličine tumora sa milanskim kriterijima prikazane su u Tablici 8.

Tablica 8. Usporedba veličine HCK-a i milanskih kriterija

		Veličina tumora				
		**	1	2	3	Σ
Milanski kriteriji	* 1		23	7	0	30
	2		14	20	7	41
Σ			37	27	7	71

$\chi^2 = 37.83$; s.s.= 2; **P = 0.000**

*1 unutar milanskih kriterija; 2 izvan milanskih kriterija

**1 tumor veličine ≤ 3 cm; 2 tumor veličine $>3-5$ cm; 3 tumor >5 cm

Uspređujući žilnu invaziju nađena je statistički značajna razlika u usporedbi sa bolesnicima koji su bili unutar i izvan milanskih kriterija ($\chi^2 = 4.66$; s.s. = 1; **P = 0.031**). 27 bolesnika s HCK-om izvan milanskih kriterija nije imalo žilnu invaziju, dok ih je 14 koji su izvan milanskih kriterija imalo prisutnu žilnu invaziju. Svih 30 bolesnika s HCK-om koji su bili unutar milanskih kriterija nisu imali prisutnu žilnu invaziju tumora. Karakteristike usporedbe žilne invazije i milanskih kriterija prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Usporedba žilne invazije HCK-a i milanskih kriterija

		Žilna invazija			
		**	1	2	Σ
Milanski kriteriji	*	1	30	0	30
		2	27	14	41
Σ			57	14	71

$\chi^2 = 4.66$; s.s.= 1; **P = 0.031**

*1 unutar milanskih kriterija; 2 izvan milanskih kriterija

**1 odsutna žilna invazija; 2 prisutna žilna invazija

Analizirajući ostale morfološke karakteristike HCK-a - histološki i arhitekturni tip rasta, stupanj diferencijacije tumora i prisutnost metastaza, kod bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija nije nađena statistički značajna razlika.

Uspoređujući karakteristike pozitiviteta, lokalizacije i intenziteta izraženosti ispitivanih biljega GPC3, beta-katenina i CD34 u HCK-u bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija nije nađena statistički značajna razlika.

5.4 Usporedba morfoloških karakteristika HCK-a i karakteristika izraženosti GPC3, beta-katenina i CD34 s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima

5.4.1 Usporedba morfoloških karakteristika HCK-a s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima.

U opisanoj skupini bolesnika analizirani su slijedeći klinički i laboratorijski pokazatelji: dob, spol, uzrok ciroze, serumski alfa-fetoprotein, protrombinsko vrijeme, ukupni bilirubin, kreatinin, vrijeme do ponovne pojave tumora i ukupno preživljenje bolesnika.

Analizirajući veličinu tumora uočena je statistički značajna razlika s obzirom na uzrok ciroze ($\chi^2 = 26.64$; s.s. = 10; **P = 0.006**). Tumori ≤ 3 cm bili su češće prisutni u bolesnika s alkoholnom cirozom, dok su tumori veličine $> 3 - 5$ cm češće nađeni u bolesnika s cirozom uzrokovanom HCV-om. Karakteristike usporedbe veličine tumora i uzoka ciroze prikazane su u Tablici 10.

Tablica 10. Usporedba veličine HCK-a i uzroka ciroze

	Uzroci ciroze						Σ	
	**	1	2	3	4	5		
Veličina tumora	*	1	20	0	11	4	1	36
		2	8	3	10	4	1	26
		3	2	2	1	0	0	5
Σ		30	5	22	8	2		67

$\chi^2 = 24.64$; s.s.= 10; **P = 0.006**

*1 tumor veličine ≤ 3 cm; 2 tumor veličine $>3-5$ cm; 3 tumor >5 cm

**1 alkohol; 2 kriptogena; 3 HCV; 4 HBV; 5 primarna bilijarna ciroza

Analizom arhitekturnog tipa rasta tumora sa uzrocima ciroze uočena je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 33.93$; s.s. = 15; **P = 0.003**). Trabekularan tip rasta HCK-a češće je prisutan u bolesnika s cirozom uzrokovanom alkoholom i HCV-om. Karakteristike usporedbe arhitekturnog tipa rasta tumora sa uzrocima ciroze prikazane su u Tablici 11.

Tablica 11. Usporedba arhitekturnog tipa rasta HCK-a i uzroka ciroze

		Uzroci ciroze						
		**	1	2	3	4	5	Σ
Arhitekturni tip rasta	*	1	16	3	15	5	1	40
		2	2	0	0	0	0	2
		3	1	0	2	0	1	4
		4	11	2	5	3	0	21
Σ			30	5	22	8	2	67

$\chi^2 = 33.93$; s.s.= 15; **P = 0.003**

*1 trabekularan; 2 acinaran; 3 solidan; 4 miješani

**1 alkohol; 2 kriptogena; 3 HCV; 4 HBV; 5 primarna bilijarna ciroza

Uspoređujući stupanj diferencijacije HCK-a sa uzrocima ciroze uočena je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 24.02$; s.s. = 10; **P = 0.008**). Umjeren stupanj diferencijacije HCK-a bio je češće prisutan u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre. Karakteristike usporedbe etiologije ciroze sa stupnjem diferencijacije tumora prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Usporedba stupnja diferencijacije HCK-a i uzroka ciroze

		Uzroci ciroze						
		**	1	2	3	4	5	Σ
Stupanj diferencijacije	*	1	4	2	4	2	0	12
		2	25	2	15	6	0	48
		3	1	1	3	0	2	7
Σ		30	5	22	8	2	67	

$\chi^2 = 24.02$; s.s.= 10; **P = 0.008**

*1 dobro diferencirane; 2 umjerenom diferencirane; 3 slabo diferencirane

**1 alkohol; 2 kriptogena; 3 HCV; 4 HBV; 5 primarna bilijarna ciroza

Usporedbom arhitekturnog tipa rasta HCK-a sa ponovnom pojavom tumora nađena je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 13.10$; s.s. = 3; **P = 0.004**). Bolesnici s HCK-om prevladavajućeg trabekularnog arhitekturnog tipa rasta rjeđe su imali ponovnu pojavu tumora u odnosu na bolesnike s HCK-om drugih arhitekturnih tipova rasta. Karakteristike usporedbe arhitekturnog tipa rasta HCK-a sa ponovnom pojavom tumora prikazane su u Tablici 13.

Tablica 13. Usporedba arhitekturnog tipa rasta HCK-a i ponovne pojave tumora

		Ponovna pojava tumora			
		**	1	2	Σ
Arhitekturni tip rasta	*	1	35	7	42
		2	0	3	3
		3	2	2	4
		4	18	4	22
Σ			55	16	71

$\chi^2=13.10$; s.s.= 3; **P = 0.004**

*1 trabekularan; 2 acinaran; 3 solidan; 4 miješani

**1 nije prisutna ponovna pojava tumora; 2 prisutna ponovna pojava tumora

Analizirajući i uspoređujući morfološke karakteristike tumora - broj tumora, histološki tip tumora, prisutnost žilne invazije i ostale kliničke i laboratorijske pokazatelje: dob, spol, serumski alfa-fetoprotein, protrombinsko vrijeme, ukupan bilirubin i kreatinin, nije nađena statistički značajna povezanost.

5.4.2 Usporedba karakteristika izraženosti GPC3, beta-ksenina i CD34 s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima

Usporedbom karakteristika izraženosti intenziteta beta-ksenina u tumoru sa statusom bolesnika (živ/mrtav) uočena je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 8.68$; s.s. = 2; **P = 0.013**). Jak 3+ intenzitet pozitiviteta beta-ksenina u HCK bio je češće prisutan u bolesnika koji su na zadnji dan praćenja bili živi. Karakteristike usporedbe izraženosti intenziteta beta-ksenina u tumoru sa statusom bolesnika (živ/mrtav) prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Usporedba katarakteristika izraženosti intenziteta beta-kačenina u HCK-u i statusa bolesnika (živ/mrtav)

	Status bolesnika			
	**	1	2	Σ
Intenzitet beta-kačenina u tumoru *	0	2	0	2
	1	0	0	0
	2	5	7	12
	3	46	11	57
Σ		53	18	71

$\chi^2 = 8.68$; s.s.= 2; **P = 0.013**

*0 negativno; 1+ slabo pozitivno; 2+ srednje pozitivno; 3+ jako pozitivno

**1 živ; 2 mrtav

Usporedbom karakteristika izraženosti loklizacije beta-kačenina u tumoru sa serumskom razinom ukupnog kreatinina uočena je statistički značajna razlika ($\chi^2 = 7.37$; s.s. = 1; **P = 0.005**). Bolesnici sa membranskom izraženošću beta-kačenina imali su češće normalnu razinu kreatinina. Karakteristike usporedbe izraženosti beta-kačenina u tumoru sa razinom ukupnog serumskog kreatinina u bolesnika s HCK-om prikazane su u Tablici 15.

Tablica 15. Usporedba karakteristika izraženosti lokalizacije beta-katenina u HCK-u i razine ukupnog serumskog kreatinina

		Beta-katenin lokalizacija			
		**	1	2	Σ
Kreatinin	*	1	61	0	61
		2	7	1	8
Σ			68	1	69

$$\chi^2 = 7.37; \text{ s.s.} = 1; \mathbf{P} = \mathbf{0.005}$$

*1 normalna razina kreatinina; 2 povišena razina kreatinina

**1 membranski; 2 citoplazmatski

Usporedbom karakteristika izraženosti pozitiviteta, lokalizacije i intenziteta GPC3 i pozitiviteta CD34 s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima nije nađena statistički značajna povezanost.

5.4.3 Usporedba kliničkih i laboratorijskih pokazatelja bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija

Analizirajući bolesnike unutar i izvan milanskih kriterija nađena je statistički značajna razlika u usporedbi sa razinama ukupnog serumskog bilirubina ($\chi^2 = 3.97; \text{ s.s.} = 1; \mathbf{P} = \mathbf{0.046}$). Bolesnici izvan milanskih kriterija imali su češće povišenu vrijednost ukupnog serumskog bilirubina. Karakteristike usporedbe bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija i ukupnog serumskog bilirubina prikazane su u Tablici 16.

Tablica 16. Usporedba bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija i ukupnog serumskog bilirubina

		Milanski kriteriji			Σ
		**	1	2	
Bilirubin	*	1	0	6	6
		2	29	34	63
Σ			29	40	69

$$\chi^2 = 3.97; \text{ s.s.} = 1; \mathbf{P} = \mathbf{0.046}$$

*1 normalna razina bilirubina; 2 povišena razina bilirubina

**1 unutar milanskih kriterija; 2 izvan milanskih kriterija

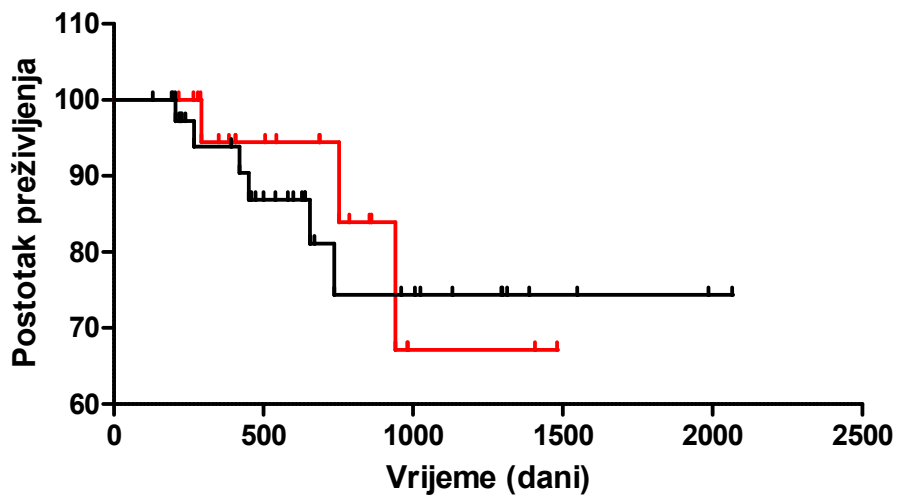
Analizirajući ostale kliničke i laboratorijske pokazatelje bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija - dob, spol, uzrok ciroze, serumski alfa-fetoprotein, protrombinsko vrijeme, kreatinin, ponovna pojava tumora i ukupno preživljenje bolesnika, nije nađena statistički značajna povezanost.

5.5 Utjecaj morfoloških karakteristika, karakteristika izraženosti ispitivanih biljega, kliničkih i laboratorijskih pokazatelja na ishod bolesnika s HCK-om

U analizi utjecaja karakteristika na ishod bolesnika, koji uključuje ukupno preživljenje i vrijeme do ponovne pojave tumora, uključena su 62 bolesnika. 9 bolesnika s ukupnim vremenom praćenja kraćim od 100 dana isključena su iz navedene analize.

5.5.1 Utjecaj morfoloških karakteristika na ukupno preživljenje i vrijeme do ponovne pojave tumora bolesnika s HCK-om

Unatoč pokazateljima za bolji ishod bolesnika koji su transplantirani unutar milanskih kriterija, u analiziranoj skupini bolesnika nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija (Log-rank (Mantel-Cox) test=0.09660, P = 0.7560) (slika 10).



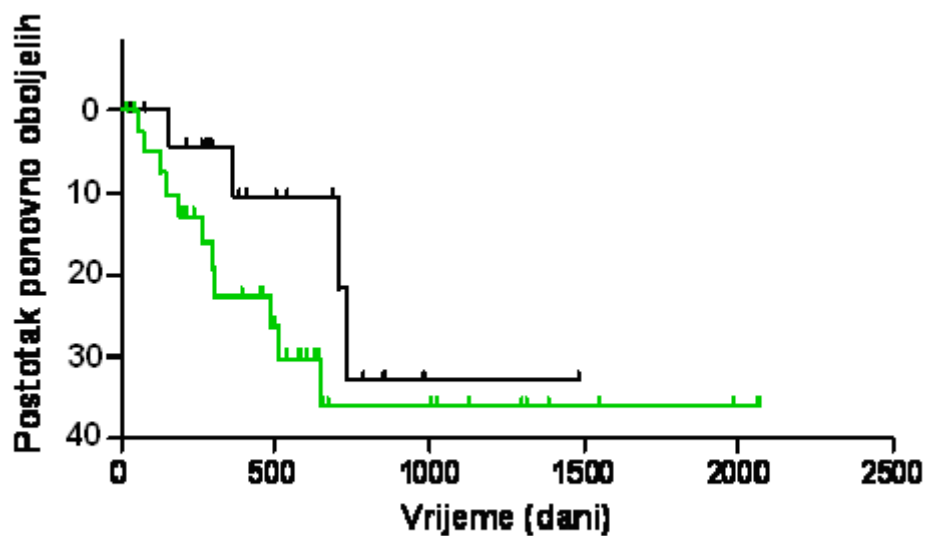
— bolesnici unutar milanskih kriterija
— bolesnici izvan milanskih kriterija

Log-rank (Mantel-Cox) test = 0.09660, P = 0.7560

Slika 10. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za bolesnike s HCK-om unutar i izvan milanskih kriterija

Analizom preživljenja podskupina bolesnika određenih brojem, veličinom, stupnjem diferencijacije i arhitekturnim tipom rasta, prisutnom žilnom invazijom i metastaza, nije nađena statistički značajna razlika.

Analizom vremena do ponovne pojave tumora bolesnika transplantiranih unutar i izvan milanskih kriterija nije nađena statistički značajna razlika (Log-rank (Mantel-Cox) test = 1.074, P = 0.3001) (slika 11).



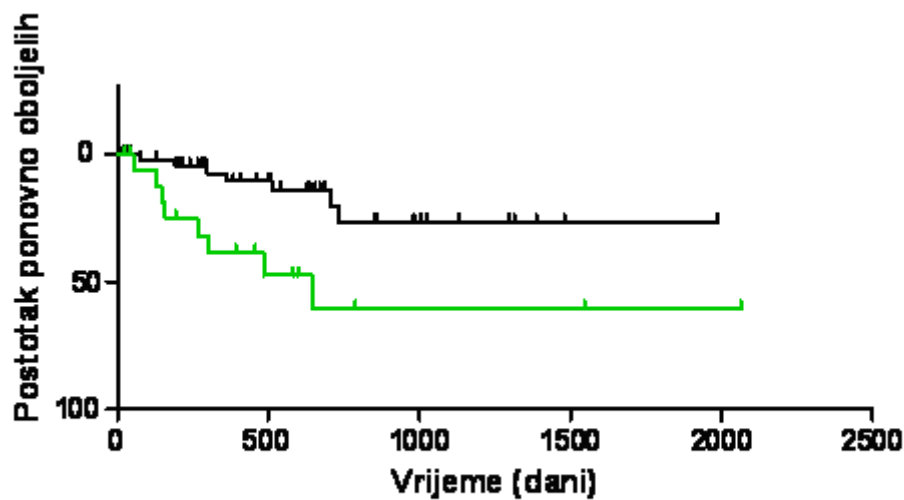
— bolesnici izvan milanskih kriterija

— bolesnici unutar milanskih kriterija

Log-rank (Mantel-Cox) test = 1.074, P = 0.3001

Slika 11. Krivulja predviđanja događaja (ponovna pojava tumora) za bolesnike unutar i izvan milanskih kriterija

Analizom vremena do ponovne pojave tumora bolesnika s prisutnom i bez prisutne žilne invazije nađena je statistički značajna razlika (Log-rank (Mantel-Cox) test = 8.368, P = 0.0038) (slika 12), dok analizom podskupina bolesnika određenih brojem, veličinom, stupnjem diferencijacije, arhitekturnim tipom rasta i prisutnim metastazama, nije nađena statistički značajna razlika.



— bolesnici s prisutnom žilnom invazijom

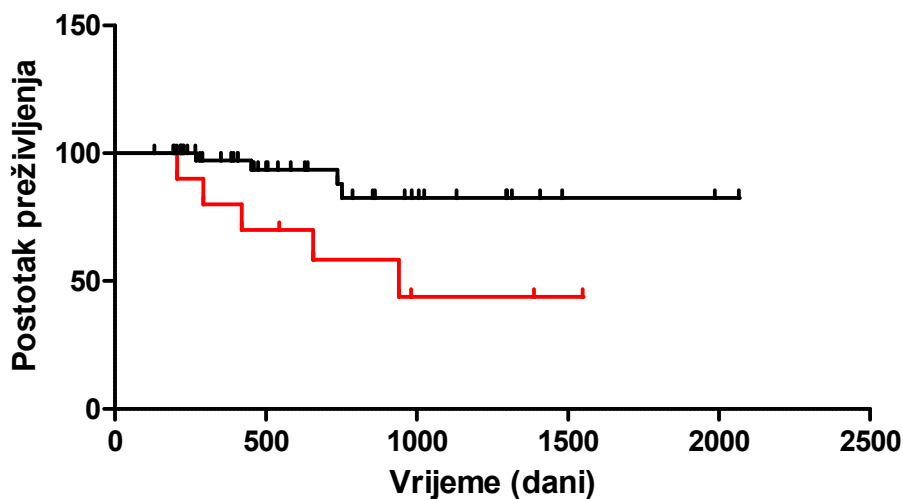
— bolesnici bez prisutne žilne invazije

Log-rank (Mantel-Cox) test = 8.368, P = 0.0038

Slika 12. Krivulja predviđanja događaja (ponovna pojava tumora) za bolesnike s prisutnom i bez prisutne žilne invazije tumora

5.5.2 Utjecaj karakteristika izraženosti ispitivanih biljega na ukupno preživljenje i vrijeme do ponovne pojave tumora bolesnika s HCK-om

Analizom preživljenja podskupina bolesnika određenih karakteristikama intenziteta izraženosti beta-kašenina nađena je statistički značajna razlika (Log-rank (Mantel-Cox) test = 6.097, P = 0.0135) (slika 13). Bolesnici s jakim, 3+ intenzitetom izraženosti beta-kašenina imali su dulje preživljenje.



└─ bolesnici sa srednjim, 2+ intenzitetom izraženosti beta-kašenina

└─ bolesnici sa jakim, 3+ intenzitetom izraženosti beta-kašenina

Log-rank (Mantel-Cox) test = 6.097, P = 0.0135

Slika 13. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za bolesnike s HCK-om i intenzitetom izraženosti beta-kašenina u tumoru

Analizom preživljenja i analizom vremena do ponovne pojave tumora podskupina bolesnika određenih karakteristikama izraženosti pozitiviteta, lokalizacije i intenziteta GPC3, te pozitiviteta CD34, nije nađena statistički značajna razlika.

5.5.3 Utjecaj kliničkih i laboratorijskih pokazatelja na ukupno preživljenje i vrijeme do ponovne pojave tumora bolesnika s HCK-om

Analizom preživljenja podskupina bolesnika određenih kliničkim i laboratorijskim pokazateljima – dob, spol, uzrok ciroze, serumski alfa-fetoprotein, protrombinsko vrijeme, ukupni bilirubin te kreatinin, nije nađena statistički značajna razlika. Također analizom vremena do ponovne pojave tumora navedene podskupine bolesnika nisu se statistički značajno razlikovale.

6. RASPRAVA

U analiziranoj skupini 71 bolesnika s HCK-om, liječenih transplantacijom jetre, većina HCK-a su bili ≤ 3 cm, s prisutna 2-3 tumora, prevladavajućeg trabekularnog tipa rasta i umjerenog stupnja diferencijacije. 30 bolesnika je bilo unutar i 41 bolesnik izvan milanskih kriterija. Kod 14 bolesnika bila je prisutna žilna invazija tumora. S obzirom na karakteristike izraženosti analiziranih biljega u HCK-u pozitivna izraženost GPC3 prisutna je u 67.60% slučajeva, citoplazmatske lokalizacije (95.77%), jakog 3+ intenziteta (81.25%). Pozitivna izraženost beta-katenina bila je prisutna u svim HCK-a, membranske lokalizacije (98.59%), jakog intenziteta (80%). Izraženost CD34 u svim slučajevima bila je jakog 4+ i srednje jakog 3+ intenziteta. Membranska lokalizacija beta-katenina bila je prisutna u svim HCK-a, ostale karakteristike izraženosti beta-katenina, GPC3 i CD34 nisu bile statistički značajno povezane niti s jednom analiziranom morfološkom karakteristikom HCK-a. Milanski kriteriji jasno su definirani brojem, veličinom tumora i žilnom invazijom, bez povezanosti s drugim morfološkim karakteristikama HCK-a. Karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet biljega GPC3, beta-katenina i CD34 ne razlikuju se u skupinama bolesnika određenih milanskim kriterijima. Skupina bolesnika izvan milanskih kriterija imala je statistički značajno češće više razine bilirubina, dok nije nađena povezanost niti sa jednim drugim analiziranim kliničkim pokazateljem. Analizirane skupine bolesnika određene milanskim kriterijima nisu se razlikovale ukupnim preživljenjem, niti vremenom do ponovne pojave bolesti. Žilna invazija bila je statistički značajno češće prisutna u skupini bolesnika s kraćim vremenom do ponovne pojave bolesti. Jaki 3+ intenzitet izraženosti beta-katenina bio je statistički značajno češće prisutan u skupini bolesnika dužeg ukupnog preživljenja.

Bez primjerenog liječenja medijan preživljenja bolesnika s HCK-om u ranom stadiju je 6 - 9 mjeseci i 1 - 2 mjeseca u uznapredovalom stadiju. Jedini kurativni oblici liječenja su kirurška resekcija ili transplantacija jetre. Različite metode lokalne terapije - perkutana ablacija, transarterijska kemoembolizacija, transarterijska radioembolizacija, te terapija sorafenibom koriste se za palijativno liječenje ili smanjenje tumora prije resekcije ili transplantacije (125, 126).

Transplantacija jetre je preporučljiv terapijski pristup u bolesnika s HCK-om unutar milanskih kriterija u kojih se postiže odlično 5-godišnje preživljenje (35, 127). Osim strogih milanskih

kriterija postoje prošireni kriteriji za transplantaciju jetre, kao što su kriteriji - *University of California, San Francisco Criteria* (UCSF), *Pittsburg TNM* i *Mount Sinai* kriteriji (127). Prema UCSF kriterijima korist od transplantacije bi moglo imati 5-20% bolesnika koji bi inače bili isključeni s transplantacijske liste s obzirom na milanske kriterije (39, 128). Nakon prihvaćanja milanskih kriterija, neke studije su pokazale da su mnoge eksplantirane jetre s HCK-om, koje su zadovoljavale manje restriktivne kriterije nego one utvrđene milanskim, također pokazale slično jednogodišnje i petogodišnje preživljenje (19, 35, 39, 127-130). Transplantacija jetre u bolesnika s HCK-om većim od 5 cm može biti prikladna za bolesnike s niskim serumskim razinama alfafetoproteina, jednim žarištem tumora i visokim stupnjem diferenciranosti (10, 11, 32, 35). Međutim, prošireni milanski kriteriji ograničeni su dostupnošću organa i produljivanjem vremena do transplantacije na transplantacijskoj listi, uz manje povoljan ishod (34).

Postoji potreba za kreiranjem univerzalnih, novih kriterija prema kojima bi se provodila transplantacija, a čime bi se smanjio broj bolesnika, koji bi neispunjavajući postojeće kriterije, bili isključeni s transplantacijske liste (10, 35, 39, 128, 131). U svrhu smanjenja vremena do transplantacije bolesnika na transplantacijskoj listi, 2002. godine izrađen je model bodovanja težine krajnjeg stadija jetrene bolesti MELD, koji je zamijenio *Child-Pugh* sistem (35). MELD zbroj se koristi u određivanju rizika smrtnosti bolesnika sa kroničnom jetrenom bolesti i cirozom, te predstavlja važan instrument jetrene alokacije (35, 127). MELD zbroj uključuje laboratorijske pokazatelje protrombinsko vrijeme, ukupni bilirubin i kreatinin. Bolesnici sa većim MELD zbrojem imaju veću vjerojatnost smrtnosti i ovi bolesnici imaju prednost na transplantacijskoj listi. Neki bolesnici s HCK-om često imaju niži MELD zbroj u vrijeme dijagnoze unatoč lošijoj prognozi (35).

Određivanje stadija bolesti koristi se za predviđanje ishoda bolesnika s HCK-om i određivanja specifične terapije obzirom na stadij (31, 132). U onkologiji je patološki stadij HCK-a glavni pokazatelj terapije i ishoda, ali je u cjelosti prognoza HCK-a složenija i osim patološkog stadija HCK-a, na ishod utječe i funkcija kronično oboljele jetre (31). Postoje brojne klasifikacije stadija bolesti bolesnika s HCK-om (133). *The Barcelona-Clinic Liver Cancer* (BCLC) i *Cancer of the liver Italian program* (CLIP) su široko primjenjivani kriteriji za određivanje stadija bolesti bolesnika s HCK-om u Europi i SAD-u. Navedeni kriteriji uključuju proširenost, odnosno patološki stadij novotvorine, pokazatelje funkcije jetre i općeg kliničkog statusa bolesnika (31, 133, 134). *Tumor, node, metastasis* klasifikacija (TNM), opće prihvaćena za određivanje patološkog stadija novotvorine, predviđa ishod bolesnika s HCK-om nakon transplantacije, a bolesnike dijeli na temelju veličine i broja novotvorina, postojanja

žilne invazije, statusa regionalnih limfnih čvorova i prisutnosti udaljenih metastaza (4, 31, 35, 132). Zatim, Okuda sistem određivanja stadija bolesti bolesnika s HCK-om uključuje pokazatelje povezane s jetrenom funkcijom (bilirubin, albumin, ascites) i veličinu tumora (31). Vremenom su se pojavile brojne druge klasifikacije (*Japanese Integrated Staging (JIS)*, *Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire (GRETCH)*), ali većina nije opće prihvaćena (31, 133).

Zbog različitosti dosadašnjih predloženih kriterija za određivanje stadija bolesti bolesnika s HCK-om, u tijeku su brojna ispitivanja genetskih, molekularnih i bioloških značajki HCK-a, koje bi mogle pomoći u točnijem svrstavanju bolesnika u homogene skupine s odabirom pripadajućeg terapijskog pristupa i predviđanja ishoda. Patološki pokazatelji kao što su veličina, broj novotvorina, žilna invazija i TNM stadij su među najboljim pokazateljima ponovne pojave bolesti i ishoda bolesnika. Dosadašnja molekularna istraživanja otkrila su brojne biološke značajke kao moguće prognostičke biljege, ali se niti jedan biljeg nije pokazao dovoljno specifičnim (120). Međutim kombinacija patoloških pokazatelja i nekih molekularnih biljega mogla bi imati koristi u dijagnostici i liječenju HCK-a, unatoč važećem određivanju stadija bolesti bolesnika s HCK-om (36, 120).

Veći broj naših bolesnika nije se uklapao u milanske kriterije što može dijelom ukazivati na manjkavosti radioloških metoda u prijetransplantacijskoj obradi. Međutim, zbog ograničenosti slikovnih metoda mala je vjerojatnost uočavanja HCK-a manjih od 1 cm, a radiološkim metodama se ne može dokazati mikroskopska žilna invazija (31, 36). Rani HCK-i i prezloćudne promjene se zbog nedostatnosti radioloških pokazatelja i umjerene histološke atipije teško dijagnosticiraju, zbog čega se još uvijek intenzivno ispituju prihvatljivi biljezi koji bi bili korisni u ranoj dijagnozi HCK-a (4). U radu Sotiropoulos i sur (135) opisano je samo 10 (14.3%) bolesnika s HCK-om od njih 70, koji su radiološki, prijetransplantacijski imali pravilno određenu veličinu tumora.

U literaturi se opisuje veličina novotvorine kao značajan prognostički pokazatelj ponovne pojave bolesti (136-139). Iwatsuki i sur (140) su opisali nekoliko pokazatelja u predviđanju ukupnog preživljenja bolesti i ponovne pojave bolesti kod 344 bolesnika s HCK-om - broj i veličina novotvorine, zahvaćenost jednog ili više režnjeva, žilna invazija i stupanj diferencijacije. Prisutnost novotvorine u oba režnja jetre, novotvorine veće od 2 cm i prisutnost žilne invazije su izdvojeni kao neovisni, značajno, loši prognostički pokazatelj (140). Jonas i sur (125) su pokazali da žilna invazija i stupanj diferencijacije HCK-a predstavljaju važne prognostičke pokazatelje u multivariatnoj analizi. U njihovom istraživanju žilna invazija je značajno manje bila prisutna u bolesnika sa dobro diferenciranim HCK-om u

usporedbi sa umjerenim i slabo diferenciranim novotvorinama. Pokazali su i da su veličina novotvorine i stupanj diferenciranosti ujedno povezani s žilnom invazijom (125). Iako je žilna invazija značajan pokazatelj ponovne pojave bolesti, teško je prisutnost iste otkriti prije transplantacije, a bolesnici koji su transplantirani izvan milanskih kriterija u većem su riziku za pojavu žilne invazije i ponovnu pojavu bolesti (32, 36, 125, 140, 141). Veličina, broj i histološki stupanj diferenciranosti novotvorine povezani su sa prisutnošću žilne invazije što u predtransplantacijskoj obradi može pomoći u pravilnom odabiru bolesnika za transplantaciju (32, 125, 142). Hemminga i sur (141) su opisali manju učestalost mikrožilne invazije za sve novotvorine veličine do 5 cm, dok je za veće novotvorine učestalost veća, te da bolesnici s prisutnom žilnom invazijom imaju lošije ukupno petogodišnje preživljenje u odnosu na bolesnike bez prisutne žilne invazije, 33% prema 68%. U literaturi se u nekoliko radova opisuje žilna invazija kao pokazatelj rizika ponovne pojave novotvorine nakon transplantacije (131, 143-146).

Razumijevanje molekularne patogeneze nastanka HCK-a i regulatornih mehanizama u prezloćudnim lezijama može pomoći u pronalaženju važnih biljega npr. beta-katenin, p53, koji bi bili korisni u ranom dijagnostičiranju novotvorina jetre, stupnjevanju novotvorina te njihova moguća prognostička i terapijska primjena (15, 16, 28, 113).

U našem radu analizirali smo karakteristike izraženosti imunohistokemijskih biljega GPC3, beta-katenin i CD34, s pretpostavkom njihovog mogućeg uvođenja u dijagnostičke postupke i ispitivanja utjecaja na ishod bolesnika s HCK-om. Osim GPC3 u posljednje vrijeme se ispituje sve veći broj mogućih biljega kao npr beta-katenin, CD34, koji bi bili korisni u dijagnostici i liječenju HCK-a (4, 105, 110, 112). U našem smo radu imunohistokemijskom analizom karakteristika izraženosti GPC3 bolesnike prema postotku pozitivnih zloćudnih stanica < 10 % i > 10 % podijelili u dvije skupine. Pozitivnih uzoraka s prisutnim obojenjem u > 10 % zloćudnih stanica bilo je u 67.76 %. Izraženost je bila većinom citoplazmatska, jakog intenziteta. U nekim radovima pozitivnim rezultatom izraženosti GPC3 se smatralo > 5% stanica s prisutnom obojenošću, a u nekim > 10% stanica (41, 54, 67, 71, 80). Opisana lokalizacija izraženost GPC3 je bila citoplazmatska, membranska, a u nekima i membranska i citoplazmatska (41, 42, 67, 71, 81). U HCK-ima male veličine visoka specifičnost i osjetljivost GPC3 od izuzetne je važnosti u dijagnostici HCK-a (4). Do sada je opisan kao dijagnostički biljeg u 26 radova (1, 41, 43, 52, 54, 63-82), a u četiri rada je opisan kao prognostički biljeg (81, 83-85). U literaturi je opisana imunohistokemijski veća izraženost GPC3 u slabije diferenciranim HCK-a, i to učestalije membranske lokalizacije (63, 67, 81, 83, 147). U radu Shirakawa i sur (83) većina GPC3 pozitivnih slučajeva je bila citoplazmatske

lokalizacije, a izraženost biljega je bila veća u slabije diferenciranim HCK-ima. Osim toga u opisanom radu je pokazan statistički značajan prognostički utjecaj GPC3, bolesnici s pozitivnom izraženošću GPC3 su imali značajno lošije 5-godišnje preživljenje. U radu Yu i sur (85), 100 bolesnika sa HCK-om uzrokovanim HBV-om, veličine do 5 cm liječen je resekcijom jetre, te imunohistokemijski analizirano na prisutnost GPC3. Statistički značajnim se pokazala povezanost biljega s ukupnim preživljenjem pri čemu su bolesnici sa povišenom izraženošću GPC3 u tumoru imali kraće ukupno preživljenje (85). Yorita i sur (84) su analizirali prisutnost GPC3 u 194 bolesnika s HCK-om, te ih podijelili s obzirom na tri načina membranske izraženosti biljega (kružna, kanalikularna, luminalna) i citoplazmatske izraženosti pri čemu je kružna membranska prisutnost biljega bio pokazatelj lošijeg ishoda poglavito u bolesnika s HCK-om povezanim s HCV-om. Akutsu i sur (54) su opisali izraženost GPC3 u većem postotku bolesnika s nuklearnom/citoplazmatskom lokalizacijom beta-katenina u HCK-u, što govori o povezanosti GPC3 i Wnt/beta-katenin signalnog puta, dok nije bilo povezanosti GPC3 sa morfološkim niti kliničkim pokazateljima. Time se opisuje moguća povezanost i uloga GPC3 u nuklearno/citoplazmatskoj lokalizaciji beta-katenina, te moguća povezanost GPC3 i signalnih molekula rasta u HCK-u i njegova primjena u imunoterapiji (54). Osim dijagnostičke uloge u tkivu i u serumu, ispituje se i njegova moguća i atraktivna terapijska primjena (52, 54, 62, 72, 73, 87-89).

U našem radu izraženost beta-katenina je bila membranska u svim tumorima, jakog intenziteta. U literaturi se opisuje različita lokalizacija izraženosti beta-katenina - citoplazmatska, membranska, nuklearna, te često prisutne kombinacije (97, 98, 113, 114, 118, 148-150). U nekim radovima se pozitivnim rezultatom smatralo > 5% stanica s prisutnim obojenjem, a u nekim više od 10% (114, 118, 151). Opisana je membranska izraženost u dobro diferenciranim HCK-a, te nuklearna izraženost u slabije diferenciranim tumorima (113, 118, 148, 149, 152-154). Mutacije beta-katenina vode nakupljanju beta-katenina i mogu biti povezane sa zloćudnom progresijom HCK-a (150). U literaturi se opisuje povezanost mutiranog oblika beta-katenina nuklearne lokalizacije sa boljim ishodom, a osim toga mutacije beta-katenina su učestalije u HCK-a povezanim s HCV (98, 112, 154-156). U nekim radovima se opisuje nuklearna izraženost beta-katenina koja bi mogla imati utjecaja na lošiji ishod bolesnika te je povezana sa žilnom invazijom i učestalije se pojavljuje u slabije diferenciranim HCK-a (107,153,157,158). Wong i sur (154) opisuju citoplazmatsko/membransku lokalizaciju beta-katenina povezanu s lošijim ishodom bolesnika. Međutim, Suzuki i sur (148), i Liem i sur (149) su opisali učestaliju membransku i citoplazmatsku izraženost beta-katenna u dobro i umjereno diferenciranim HCK-ima, dok je

nuklearna lokalizacija biljega bila učestalije prisutna u HCK-u slabijeg stupnja difrenciranosti i to učestalije u HCK-u povezanim sa HBV infekcijom, što se objašnjava ulaskom beta-katenina u jezgru, njegovim vezanjem na T-stanični faktor te regulacijom transkripcijskih gena kao što je cyclin D1.

U našem radu imunohistokemijskom analizom CD34 je bio izražen u većine tumora (91.54 %), jakog intenziteta. CD34 osim kao pouzdan biljeg neoangiogeneze, povezan je i sa stupnjem diferencijacije tumora, te može poslužiti u razlikovanju displastičnih čvorova od HCK-a, ali i u otkrivanju bolesnika s povećanim rizikom od ponovne pojave bolesti (9, 121-124). U radu Yan i sur (122) opisana je pozitivna izraženost CD34 u 65.4% HCK-a, i ta skupina bolesnika imala je kraće ukupno preživljenje, što govori u prilog CD34 kao važnog prognostičkog biljega. Tung-Ping Poon i sur (124) su opisali značajnost mikrožilne gustoće novotvorine, prikazane imunohistokemijski sa CD34, kao važnog ranog prognostičkog pokazatelja ponovne pojave novotvorine nakon resekcije, što vrijedi za novotvorine manje od 5 cm.

Pretpostavka našeg istraživanja bila je da će pozitivna izraženost GPC3 jakog intenziteta, uz nuklearnu izraženost beta-katenina i jaku sinusoidalnu izraženost CD34 u skupini HCK-a unutar milanskih kriterija izdvojiti bolesnike s kraćim preživljenjem nakon transplantacije, odnosno izostanak navedenih biljega u HCK-u izvan milanskih kriterija izdvojiti bolesnike s boljim ishodom. Karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet biljega GPC3, beta-katenina i CD34 nisu se razlikovale u analiziranim skupinama bolesnika određenih milanskim kriterijima. U našoj analiziranoj skupini bolesnici unutar i izvan milanskih kriterija nisu se razlikovali s obzirom na ponovnu pojavu HCK-a i ukupno preživljenje. Također, prema podacima iz literature, milanski kriteriji iako opće prihvaćeni, ne izdvajaju jednoznačno skupine bolesnika s boljim i lošijim ishodom nakon transplantacije jetre (10, 35, 39, 127, 129, 130). Osim toga naši rezultati pokazuju da transplantirani bolesnici jakog (3+) intenziteta, membranske izraženosti beta-katenina u HCK-u imaju duže ukupno preživljenje što odgovara literaturnim podacima (148, 149) Bolesnici s prisutnom žilnom invazijom HCK-a imaju kraće vrijeme do ponovne pojave tumora nakon transplantacije, što je također u skladu sa objavljenim radovima (32, 131, 140, 142-146, 151).

Pristup u dijagnostici i liječenju HCK-a oslanja se na otkrivanje manjih tumora, po mogućnosti prezloćudnih promjena jetre, a trenutno su jedni kurativni pristupi u liječenju HCK-a resekcija i transplantacija (33). U konačnici i dalje postoji potreba za randomiziranim istraživanjima načina liječenja HCK-a ali i stalna potraga za pronalaženjem primjenjivih bioloških, molekularnih i patohistoloških obilježja HCK-a kojima bi se mogla otkriti rana

predtransplantacijska lezija i pronalaženje pokazatelja koji bi poslužili predviđanju ishoda bolesnika sa HCK-om.

7. ZAKLJUČCI:

1. Morfološke karakteristike broja i veličine HCK-a, te prisutnost žilne invazije jasno definiraju milanske kriterije, dok se druge morfološke karakteristike HCK-a – arhitekturni tip, stupanj diferencijacije i prisutnost metastaza ne razlikuju u skupinama bolesnika određenih milanskim kriterijima.

2. HCK-om karakteriziran je visokom pozitivnom izraženošću GPC3 citoplazmatske lokalizacije i jakog intenziteta.

3. Beta-katenin izražen je u svim HCK-a, membranske lokalizacije i jakog intenziteta.

4. HCK-om karakteriziran je jakom izraženošću CD34.

5. Karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet analiziranih biljega GPC3, beta-katenina i CD34, ne razlikuju se s obzirom na morfološke karakteristike HCK-a.

6. Karakteristike izraženosti pozitivitet, lokalizacija i intenzitet analiziranih biljega GPC3, beta-katenina i CD34, ne razlikuju se u skupinama bolesnika određenih milanskim kriterijima.

7. Milanski kriteriji ne utječu uvijek na ishod transplantiranih bolesnika s HCK-om.

8. Transplantirani bolesnici s jakim 3+ intenzitetom izraženosti beta-katenina u HCK-u pokazuju statistički značajno duže ukupno preživljenje.

9. Transplantirani bolesnici s prisutnom žilnom invazijom HCK-a imaju statistički značajno kraće vrijeme do ponovne pojave tumora nakon transplantacije.

8. SAŽETAK

Izraženost glipikana-3, beta-katenina i CD34 u hepatocelularnom karcinomu bolesnika s transplantiranom jetrom

Cilj istraživanja je bio odrediti morfološke karakteristike hepatocelularnog karcinoma (HCK-a), kliničke i laboratorijske pokazatelje i imunohistokemijske karakteristike izraženosti glipikana-3 (GPC3), beta-katenina i CD34 u HCK-u, njihovu međusobnu povezanost te utjecaj na ishod bolesnika unutar i izvan milanskih kriterija.

71 bolesnik sa primarnim HCK-om, liječen je transplantacijom jetre. Analizirane su morfološke karakteristike tumora - broj i veličina, arhitekturni tip rasta, histološki tip, stupanj diferencijacije, prisutnost makro i mikrožilne invazije.

30 bolesnika je bilo unutar milanskih kriterija i 41 bolesnik izvan milanskih kriterija. Kod 14 bolesnika je bila prisutna žilna invazija tumora.

Pozitivna izraženost GPC3 je bila prisutna u 67.60% slučajeva HCK-a, citoplazmatske lokalizacije. Pozitivna izraženost beta-katenina bila je prisutna u svim HCK-a, membranske lokalizacije. Izraženost CD34 u svim slučajevima bila je jakog intenziteta. Karakteristike izraženosti biljega GPC3, beta-katenina i CD34 ne razlikuju se u skupinama bolesnika određenih milanskim kriterijima. Analizirane skupine bolesnika određene milanskim kriterijima nisu se razlikovale ukupnim preživljenjem, niti vremenom do ponovne pojave bolesti. Žilna invazija bila je značajno češće prisutna u skupini bolesnika s kraćim vremenom do ponovne pojave bolesti. Jaki intenzitet izraženosti beta-katenina bio je značajno češće prisutan u skupini bolesnika dužeg ukupnog preživljenja.

9. SUMMARY

Expression of glypican-3, beta-catenin and CD34 in hepatocellular carcinoma in patients with orthotopic liver transplantation

The aim of the study was to determine morphological features of HCC, clinical and laboratory data and characteristics of immunohistochemical expression of glypican-3 (GPC3), beta - catenin and CD34 in HCC, their mutual association and prognostic value, with special regard to those patient groups meeting and those exceeding milan criteria.

71 patients with primary HCC have undergone liver transplantation. Pathological tumor characteristics - number and size of tumors, architectural pattern, histological type, differentiation grade, and macro and microvascular invasion were analyzed.

30 patients meeting and 41 exceeding milan criteria. Vascular invasion was present in 14 patients. Cytoplasmatic GPC3 positivity was observed in 67.60% cases of HCC. Membrane beta-catenin was expressed in all cases of HCCs. The strong expression of CD34 was observed in all cases of HCCs. There was no significant difference between group meeting and exceeding milan criteria according to expression's characteristics of GPC3, beta-catenin and CD34. There was no difference in survival rate and recurrence between patient groups meeting and exceeding milan criteria. Vascular invasion was more frequently observed in patients group with shorter period of recurrence. Membranous, strong intensity of beta-catenin was more frequently observed in patients group with longer survival rate.

Eva Lovrić

2012.

10. POPIS LITERATURE

1. Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol* 2010; 58:273-7.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
3. Durr R, Caselmann WH, Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:154-61.
4. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organization classification of tumours of the digestive system. 4. izd. Lyon: International agency for research on cancer; 2010; str.196-216.
5. Zhang QI, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2011; 11:86-91.
6. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127:1-16.
7. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, i sur. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007; 317:121-4.
8. Ozturk M, Arslan-Ergul A, Bagislar S, Senturk S, Yuzugullu H. Senescence and immortality in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009; 286:103-13.
9. Amarapurkar AD, Vibhav, Kim V. Angiogenesis in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 2008; 51:323-8.
10. Tanwar S, Khan AS, Grover VPB, Gwilt C, Smith B, Brown A. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15:5511-6.
11. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, i sur. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 11:693-9.
12. Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM. Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas. Philadelphia: Saunders; 2004. str.1003-14.
13. Motola-Kuba D, Zamora-Valdés D, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann Hepatol* 2006; 5:16-24.

14. Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26:144-52.
15. Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, Bernardi M. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2008; 29:1299-2008.
16. Feitelson MA, Sun B, Lale Satiroglu Tufan N, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21:2593-2604.
17. Jahan S, Sshfaq UA, Qasim M, Khaliq S, Saleem MJ, Afzal N. Hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2012; 7:1-8.
18. Choi J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:1135-50.
19. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funami K, Shimotohno K. Lipoprotein component associated hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Curr Opin Virol* 2011; 1:19-26.
20. Lai JC, Terrault NA, Vittinghoff E, Biggins SW. Height contributes to the gender difference in wait-list mortality under the MELD-based liver allocation system *Am J Transplant* 2010;10;2658-64.
21. Hashimoto E, Tokushige K. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic? *Hepatol Res* 2012; 42:1-14.
22. Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis – associated hepatocellular carcinoma: Our case series and literature review. *World J Gastroenterol* 2010; 16:1436-41.
23. Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24:695-708.
24. Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic steatohepatitis and noncirrhotic hepatocellular carcinoma: fertile soil. *Semin Liver Dis* 2012; 32:30-8.
25. Balmer ML, Dufour JF. Non-alcoholic steatohepatitis – from NAFLD to MAFLD. *Ther Umsch* 2011; 68:183-8.
26. Pinzani M. Pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis and basis for treatment. *Dig Dis* 2011; 29:243-8.
27. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterol* 2001; 120:1763-73.

28. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:185-200.
29. Wang WX, Perwez Hussain S, Huo T, i sur. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 43-7.
30. Souza MRA, Diniz MFFM, Medeiros-Filho JEM, Araujo MST. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol* 2012; 49:89-96.
31. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-17.
32. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, i sur. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver transplant* 2005; 9:1086-92.
33. Canelo MSR. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2011; 7:463-75.
34. Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM, i sur. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. *Ann Surg* 2011; 253:453-69.
35. Ishizaki Y, Kawasaki S. The evolution of liver transplantation for hepatocellular carcinoma (past, present, and future). *J Gastroenterol* 2008; 43:18-26.
36. Mazzaferro V, Chun YS, Poon RTP, i sur. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 15:1001-7.
37. Bargellini I, Sacco R, Bozzi E, i sur. Transarterial chemoembolization in very early and early-stage hepatocellular carcinoma patients excluded from curative treatment: a prospective cohort study. *Eur J Radiol* 2012; 81:1173-8.
38. Muller C. Hepatocellular carcinoma-rising incidence, changing therapeutic strategies. *Wien Med Wochenschr* 2006; 156:404-9.
39. Yao FY, Xiao L, Bass NM, Kerlan R, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant* 2007; 7:2587-96.
40. Kandil D, Cooper K. Glypican-3: A novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma and more. *Adv Anat Pathol* 2009; 16:125-9.
41. Coston WMP, Loera S, Lau SK, i sur. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:433-44.

42. Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, et al. Glypican-3 overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 2003; 103:455-465.
43. Zhang Q, Xiao Q, Lin Z, Ying X, Li Z, Lin JM. Development of a competitive radioimmunoassay for glypican-3 and the clinical application in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem* 2010; 43:1003-8.
44. Baeg GH, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N. Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wnt3. *Development* 2001; 128:87-94.
45. Zitterman S, Capurro MI, Shi W, Filmus J. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2009; 126:1291-1301.
46. Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001; 108:497-501.
47. Saitoh T, Hirai M, Katoh M. Molecular cloning and characterization of WNT3A and WNT14 clustered in human chromosome 1q42 region. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:1168-75.
48. Capurro IM, Xiang YY, Lobe C, Filmus J. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005; 65:6245-54.
49. La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8847-51.
50. Takigawa Y, Brown AM. Wnt signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets* 2008; 11:1013-24.
51. Song HH, Shi W, Xiang Y, Filmus J. The loss of Glypican-3 induces alterations in Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280:2116-25.
52. Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2011; 47:333-8.
53. Onhkawara B, Yamamoto SY, Tada M, Ueno N. Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 2003; 130:2129-38.

54. Akutsu N, Yamamoto H, Sasaki S, i sur. Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16:3521-8.
55. Sun CK, Chua MS, He J, So SK. Suppression of Glypican 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells through up-regulation of TGF-beta2. *Neoplasia* 2011; 8:735-47.
56. Cheng W, Tseng CJ, Lin TTCL, i sur. Glypican-3-mediated oncogenesis involves the insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29:1319-26.
57. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, i sur. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 1996; 12:241-7.
58. Gonzales AD, Kaya M, Shi W, i sur. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by gene that is mutated in the Simpson-Golabi-behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol* 1998; 141: 1407-14.
59. Song HH, Shi W, Filmus J. OCI-5/Rat Glypican-3 binds to fibroblast growth factor-2 but not to insulin-like growth factor-2. *J Biol Chem* 2007; 272:7574-7.
60. Cat B, Muyldermans S, Coomans C, i sur. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *J Cell Biol* 2003; 163:625-35.
61. Allegretta M, Filmus J. Therapeutic potential of targeting glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11:543-8.
62. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, i sur. Identification of Glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6612-21.
63. Yan B, Wei JJ, Qian YM, i sur. Expression and clinicopathologic significance of glypican 3 in hepatocellular carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2011; 3:162-9.
64. Du JL, Wei LX, Wang YL. Expression and clinicopathologic significance of GPC3 and other antibodies in well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 40:11-8.
65. Bian YZ, Yao DF, Zhang CG, i sur. Expression features of glypican-3 and its diagnostic and differential values in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 19:260-5.

66. Liu H, Li P, Zhai Y, i sur. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16:4410-5.
67. Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, i sur. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol* 2009; 34:649-56.
68. Wang FH, Yip YC, Zhang M, i sur. Diagnostic utility of glypican-3 for hepatocellular carcinoma on liver needle biopsy. *J Clin Pathol* 2010; 63:599-603.
69. Zou ZQ, Ding YP, Long B, i sur. Gpc-3 is a notable diagnostic, prognostic and latent targeted therapy marker in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterol* 2010; 57:1285-90.
70. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, i sur. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306:16-25.
71. Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, i sur. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod pathol* 2005; 18:1591-8.
72. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, i sur. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2003; 125:89-97.
73. Libbrecht L, Severi T, Cassiman D, i sur. Glypican-3 expression distinguish small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1405-11.
74. Sung YK, Hwang SY, Park MK, i sur. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94:259-62.
75. Yao MY, Yao DF, Bian YZ, i sur. Oncofetal antigen glypican-3 as a promising early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; 10:289-94.
76. Qiao SS, Cui ZQ, Gong L, i sur. Simultaneous measurements of serum AFP, GPC-3 and HCCR for diagnosing hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterol* 2011; 58:1718-24.
77. Shafizadeh N, Kakar S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol* 2011; 18:438-45.

78. Zhang L, Liu H, Sun L, Li N, Ding H, Zheng J. Glypican-3 as a potential differential diagnosis marker for hepatocellular carcinoma: a tissue microarray-based study. *Acta Histochem* 2012; 114:547-52.
79. Yip Yc, Wang FH, Vong HT, Zhang M, Wen JM. Significance of glypican-3 immunohistochemistry in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 40:626-8.
80. Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Diamantis KE, Terracciano LM. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:899-906.
81. Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, i sur. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30:5055-61.
82. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, i sur. Identification of soluble NH₂-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64:2418-23.
83. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, i sur. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100:1403-7.
84. Yorita K, Takahashi N, Takai H, i sur. Prognostic significance of circumferential cell surface immunoreactivity of glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2011; 31:120-31.
85. Yu MC, Lee YS, Lin SE, i sur. Recurrence and poor prognosis following resection of small hepatitis B-related hepatocellular carcinoma are associated with aberrant tumor expression profiles of glypican 3 and osteopontin. *Ann Surg Oncol* 2012; 3:455-63.
86. Lee YL, Ahn BC, Lee Y, Lee SW, Cho JY, Lee J. Targeting of hepatocellular carcinoma with glypican-3-targeting peptide ligand. *J Pept Sci* 2011; 17:763-9.
87. Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2011; 47:333-8.
88. Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, i sur. Anti-Glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. *Cancer Res* 2008; 68:9832-8.
89. Nakano K, Orita T, Nezu J, i sur. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378:279-84.
90. Ben-Ze'ev A, Geiger B. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:629-39.

91. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:95-102.
92. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:51-9.
93. Pećina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 2003; 3:17.
94. Pećina-Slaus N, Nikuseva Martić T, Deak AJ, i sur. Genetic and protein changes of E-cadherin in meningiomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136:695-702.
95. Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Zeljko M, Bulat S. Brain metastases exhibit gross deletions of the APC gene. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28:223-8.
96. Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SPS. β -catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterol* 2004; 126:1134-46.
97. Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: Analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:280-7.
98. Wong CM, Fan ST, Ng IO. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 2001; 92:136-45.
99. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1653:1-24.
100. Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25:3787-3800.
101. Monga SPS, Pediadiatakis P, Mule K, Stolz DB, Michalopoulos GK. Changes in Wnt/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 2001; 33:1098-1109.
102. Bullions LC, Levine AJ. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol* 1998; 10:81-7.
103. Hussain SZ, Sneddon T, Tan X, Micsenyi A, Michalopoulos GK, Monga SPS. Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res* 2004; 292:157-69.
104. Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer cell* 2004; 6:497-506.

105. Fatima S, Lee NP, Luk JM. Dickkopfs and Wnt/beta-catenin signaling in liver cancer. *World J Clin Oncol* 2011; 2:311-25.
106. Wang X, Meng X, Sun X, DU YJ, Zhao J, Fan YJ. Wnt/ β -catenin signalling pathway may regulate cell cycle and expression of cyclin A and cyclin E protein in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Cycle* 2009; 8:1567-70.
107. Inagawa S, Itabashi M, Adachi S, i sur. Expression and prognostic roles of beta-catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8:450-6.
108. Wang B, Xunsun, Liu JY, i sur. The effect of cell cycle and expression of cyclin B1 and cyclin C protein in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and SMMC-7721 after of silencing beta-catenin gene. *Hepatogastroenterol* 2011; 59:515-8.
109. Patil MA, Lee SA, Macias E, i sur. Role ox cyclin D1 as a mediator of c-Met-and beta-catenin-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2009, 69:253-61.
110. Dahmani R, Just PA, Perret C. The Wnt/beta-catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35:709-13.
111. Nambotin SB, Wands JR, Kim M. Points of therapeutic intervention along the Wnt signaling pathway in hepatocellular carcinoma, *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 6:549-59.
112. Zeng G, Apte U, Cieply B, Singh S, Monga SPS. siRNA-mediated beta-catenin knockdown in human hepatoma cells results in decreased growth and survival. *Neoplasia* 2007, 11:951-9.
113. Lai TY, Su CC, Kuo WW, i sur. Beta-catenin plays a key role in metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2011; 2:415-22.
114. Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, i sur. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J oncol* 2004; 24:1077-83.
115. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. β -catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favourable prognosis. *Am J Pathol* 2000; 157:763-70.
116. Qin LX, Tang ZY. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130:497-513.

117. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterol* 2011; 142:219-32.
118. Wang M, Xue L, Cao Q, i sur. Expression of Notch1, Jagged1 and β -catenin and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 2009; 56:533-41.
119. Cha MY, Kim CM, Park YM, Ryu WS. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology* 2004, 39:1683-93.
120. Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8:385-92.
121. Gligorijević J, Djordjević b, Petrović A, Radirević A, Stojanović S. Expression of CD34 in cirrhotic liver-reliance to dedifferentiation. *Vojnosanit Pregl* 2010; 6:459-62.
122. Yan WW, Huang A, Li Yg, Wang SS, Dai GH. Expression of CD34 and CD117 in human hepatocellular carcinomas and the clinical significance. *Zhonghua gan Zang Bing Za Zhi* 2011; 8:588-93.
123. Nascimento C, Caroli-Bottino J, Paschoal J, Pannain VL. Vascular immunohistochemical markers: contributions to hepatocellular nodule diagnosis in explanted livers. *Transplant proc* 2009; 41:4211-13.
124. Poon RTP, Ng IOL, Lau C, i sur. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: A prospective study. *J Clin Oncol* 2001; 20: 1775-85.
125. Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, i sur. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001, 33:1080-6.
126. Tanwar S, Khan SA, Grover VPB, Gwilt C, Smith B, Brown A. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma *World J Gastroenterolo* 2009;15:5511-6.
127. Kurtovic J, Riordan SM, Williams R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19:147-60.
128. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Bacchetti P, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Comparasion of the proposed UCSF criteria with the Milan criteria and the Pittsburgh modified TNM criteria. *Liver transplant* 2002; 765-74.

129. Hanouneh IA, Macaron C, Lopez R, Aucejo F, Zein NN. Rate of tumor growth predicts recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation in patients beyond milan or UCSF criteria. *Transplant Proc* 2011; 43:3813-8.
130. Suh KS, Cho EH, Lee HW, Shin WY, Yi NJ, Lee KU. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients who do not meet the milan criteria. *Dig Dis* 2007; 25:329-33.
131. Burak KW. Prognosis in the early stages of hepatocellular carcinoma: Predicting outcomes and properly selecting patients for curative options. *Can J Gastroenterol* 2011; 25:482-4.
132. Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langar B, Perrier A. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report 2012;13:11-22.
133. Marrero JA, Kudo M, Bronowicki JP. The challenge of prognosis and staging for hepatocellular carcinoma *The Oncologist* 2010; 15:23-33.
134. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology* 2005, 42:1208-36.
135. Sotiropoulos GC, Malago M, Molmenti E, i sur. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is clinical tumor classification before transplantation realistic? *Transplant* 2005; 79:483-7.
136. Piardi T, Gheza F, Ellero B, i sur. Number and tumor size are not sufficient criteria to select patients for liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2012; 20:2020-6.
137. Ataide EC, Boin IFSF, Almeida JRS, i sur. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma recurrence: experience with 83 livertransplantation patients *Transplant Proc* 2011; 43:1362-4.
138. Marelli L, Grasso A, Pleguezuelo M, i sur. Tumour size and differentiation in predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: external validation of a new prognostic score *Ann Surg Oncol* 2008; 15:3503-11.
139. Macaron C, Hanouneh IA, Lopez R, Aucejo F, Zein NN. Total tumor volumen predicts recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation in patients beyond milan or UCSF criteria *Transplant proc* 2010; 42:4585-92.

140. Iwatsuki S, Dvorchik I, Marsh Wallis J, Madariaga JR, Carr B, Fung JJ, Starzl TE. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: A proposal of a prognostic scoring system. *J Am Coll Surg* 2000; 191:389-94.
141. Hemming AW, Cattral MS, Reed AI, Willem JW, Greig P, Howard RJ. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000; 233:652-9.
142. Esnaola NF, Lauwers GY, Mirza NQ, i sur. Predictors of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg* 2002; 2:224-32.
143. Li C, Wen TF, Liao ZX, i sur. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: recurrence characteristics and risk factors. *Hepatogastroenterology* 2010; 57:567-70.
144. Lim KC, Chow PK, Allen JC, i sur. Microvascular invasion is a better predictor of tumor recurrence and overall survival following surgical resection for hepatocellular carcinoma compared to the milan criteria. *Ann Surg* 2011;254:108-13.
145. Bozorgzadeh A, Orloff M, Abt P, i sur. Survival outcomes in liver transplantation for hepatocellular carcinoma, comparing impact of hepatitis C versus other etiology of cirrhosis. *Liver transplant* 2007; 13:807-13.
146. Lee HH, Joh JW, Park JH, i sur. Microvascular tumor embolism: independent prognostic factor after liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc* 2005; 37:1251-3.
147. Yip Yc, Wang FH, Vong HT, Zhang M, Wen JM. Significance of glypican-3 immunohistochemistry in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011; 40:626-9.
148. Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: A possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:994-1000.
149. Tien LTT, Masahiro I, Nakao M, i sur. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:2398-2401.
150. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, i sur. Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:1301-9.

151. Durnez A, Verslype C, Nevens F, i sur. The clinicopathological and β katenin prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Hystopathology* 2006; 49:138-51.
152. Ihara A, Koizumi H, Hashizume R, Uchikoshi T. Expression of epithelial cadherin and alpha-and beta-catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1996; 23:1441-7.
153. Bae SH, Jung ES, Park YM, i sur. Expression patterns of E-cadherin and beta-catenin according to clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2002; 8:297-303.
154. Wong CM, Fan ST, Ng IO. Beta-catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 2001; 92:136-45.
155. Mao TL, Chu JS, Jeng YM, Lai PL, Hsu HC. Expression of mutant nuclear beta-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis. *J Pathol* 2001; 193:95-101.
156. Huang H, Fujii H, Senkia A, i sur. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 1999; 155:1795-801.
157. Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999; 155:703-10.
158. Zulehner G, Mikula M, Schneller D, i sur. Nuclear β -Catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. *Am J Pathol* 2010; 176:472-81.

11. BIOGRAFIJA

Rođena sam 23. studenog 1976. godine u Sinju. U Zagrebu sam završila osnovnu i srednju školu.

2001. godine diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Pripravnički staž obavila sam u KBC Zagreb, i 2003. godine položila državni ispit.

Od 2007. do 2011. godine na Kliničkom Zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur sam obavila specijalistički staž iz Patološke anatomije te položila specijalistički ispit u siječnju, 2011.

U akademskoj godini 2009/2010 završila sam Stručni poslijediplomski specijalistički studij Patologija, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2010. do 2012. godine završila sam Znanstveni poslijediplomski studij Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od siječnja 2011. godine radim na Kliničkom Zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur, Zagreb.

Aktivno sam sudjelovala na 4 međunarodna i 9 domaćih znanstvenih skupova na kojima sam izlagala kao prvi autor, te kao koautor 4 kongresna rada.

Objavila sam četiri znanstvena rada citirana u CC.