

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL
DAVILA” BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL GASTROENTEROLOGIE**



***ROLUL BIOMARKERILOR SEROLOGICI IN
CARACTERIZAREA, PROGNOSTICUL SI
MONITORIZAREA CARCINOMULUI HEPATOCELULAR***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Coordonator științific:
Prof. Dr. LILIANA GHEORGHE**

**Doctorand:
CLAUDIU-RAZVAN CERBAN**

CUPRINS

Introducere

I. Partea generală.....	pagina 1
1. Epidemiologia carcinomului hepatocelular	pagina 1
1.1. Date globale	pagina 1
1.2. Date naționale.....	pagina 1
2. Etilogie și factori de risc.....	pagina 2
2.1. Virusul hepatic B	pagina 2
2.2. Virusul hepatic C	pagina 3
2.3. Alcoolul	pagina 4
2.4. Boala ficatului gras non-alcoolic	pagina 4
2.5. Patogeneza carcinomului hepatocelular	pagina 5
3. Supravegherea in carcinomul hepatocelular	pagina 6
3.1. Ultrasonografia abdominală	pagina 7
3.2. Tomografia computerizată.....	pagina 8
3.3. Rezonanța magnetică.....	pagina 8
3.4. Testele serologice.....	pagina 9
4. Diagnosticul carcinomului hepatocelular.....	pagina 11
4.1. Diagnosticul radiologic al carcinomului hepatocelular	pagina 11
4.2. Diagnosticul anatomopatologic al carcinomului hepatocelular.....	pagina 13
4.3. Manifestări clinice.....	pagina 14
5. Sisteme de stadializare	pagina 16
5.1. Stadializarea BCLC	pagina 18
5.1.1. Stadiul inițial (BCLC 0/A)	pagina 18
5.1.2. Stadiul intermediar (BCLC B)	pagina 19
5.1.3. Stadiul avansat (BCLC C)	pagina 20
5.1.4. Stadiul terminal (BCLC D).....	pagina 20
6. Modalități actuale de tratament.....	pagina 21
6.1. Tratamentul chirurgical.....	pagina 21
6.1.1. Resectia chirurgicală	pagina 21
6.1.2. Transplantul hepatic	pagina 22
6.2. Tehnici ablativ locale	pagina 24
6.3. Terapii embolice locale	pagina 26
6.4. Chimioterapie sistemică	pagina 27
6.5. Evaluarea răspunsului la tratament	pagina 27
6.6. Prognosticul carcinomul hepatocelular	pagina 29
7. Nevoia de noi biomarkeri	pagina 30
7.1. Des-gamma carboxi protrombina / protrombina indusă de absența vitaminei K (DCP / PIVKA)	pagina 31
7.1.1. Introducere.....	pagina 31
7.1.2. Structura PIVKA.....	pagina 32
7.1.3. Mecanismele sintezei PIVKA	pagina 34
7.1.4. Stimularea creșterii și invaziei carcinomului hepatocelular.....	pagina 35
7.1.5. Rolul PIVKA în angiogeneza carcinomului hepatocelular	pagina 37
7.1.6. Semnificația ca marker pentru diagnosticul carcinomului hepatocelular.....	pagina 38
7.2. Glipican 3 (GPC).....	pagina 40
7.2.1. Introducere.....	pagina 40

7.2.2.	Structura	pagina 40
7.2.3.	Funcție biologică	pagina 41
7.2.4.	Expresia în malignitățile umane.....	pagina 41
7.2.5.	Expresia la pacienții cu carcinom hepatocelular	pagina 42
7.2.6.	GPC3 solubil ca marker tumoral pentru diagnosticul carcinomului hepatocelular.....	pagina 42
7.2.7.	Evaluarea imunohistochimică utilizând GPC3 pentru diagnosticul carcinomului hepatocelular	pagina 43
II Contribuții personale		pagina 45
8.	Ipoteza de lucru și obiectivele generale	pagina 45
8.1.	Ipoteze de lucru	pagina 45
8.2.	Obiective	pagina 45
8.3.	Obiective specifice incluse:.....	pagina 45
9.	Metodologia generală a cercetării.....	pagina 45
9.1.	Criteriile de includere în studiu.....	pagina 46
9.2.	Protocol de studiu	pagina 46
9.3.	Protocolul terapeutic și de evaluare a răspunsului la chemoembolizare	pagina 53
9.4.	Colectarea și stocarea sângelui EDTA și a serului.....	pagina 54
9.5.	Baza de date.....	pagina 54
9.6.	Funcțiile statistice utilizate în acest studiu	pagina 56
9.7.	Testul ELISA (imunosorbant legat de enzimă) pentru biomarkerii studiați	pagina 56
10.	Factorii predictivi pentru recurență și supraviețuire la pacienții cu carcinom hepatocelular tratați prin chemoembolizare transarterială	pagina 58
10.1.	Introducere	pagina 58
10.2.	Pacienți și metode.....	pagina 59
10.3.	Rezultate	pagina 62
10.4.	Discuții	pagina 99
10.5.	Concluzii:	pagina 103
11.	Evaluarea răspunsului tumoral utilizând alfa-fetoproteina și protrombina indusă de absența vitaminei K la pacienții cu carcinom hepatocelular tratați prin chemoembolizare trans-arterială	pagina 104
11.1.	Introducere	pagina 104
11.2.	Pacienți și metode.....	pagina 105
11.3.	Rezultate	pagina 107
11.4.	Discuții	pagina 119
11.5.	Concluzii	pagina 121
12.	Evaluarea utilității alfa-fetoproteinei și protrombinei induse de absența vitaminei K pentru diagnosticul în stadiul incipient al carcinomului hepatocelular la pacienții evaluați într-un centru de transplant hepatic	pagina 122
12.1.	Introducere	pagina 122
12.2.	Pacienți și metode.....	pagina 123
12.3.	Rezultate	pagina 125
12.4.	Discuții	pagina 134
12.5.	Concluzii	pagina 137
13.	Alfa-fetoproteina, alfa-fetoproteina-L3, proteina indusă de absența vitaminei K, glipicanul 3 și combinațiile acestora pentru diagnosticul carcinomului hepatocelular	pagina 138

13.1. Introducere	pagina 138
13.2. Pacienți și metodă	pagina 139
13.3. Rezultate	pagina 141
13.4. Discuții	pagina 154
13.5. Concluzii	pagina 157
14. Concluzii și contribuții personale	pagina 158
Bibliografie	pagina 164

PARTEA GENERALĂ

În Capitolul 1 sunt descrise date epidemiologice referitoare la incidența carcinomului hepatocelular. Carcinomul hepatocelular (CHC) este cea mai frecventă tumoră malignă hepatică, reprezentând peste 90% din neoplaziile primitive hepatice [1]. CHC reprezintă al cincilea cancer ca și frecvență la nivel global, și a treia cauză de deces prin cancer cu peste 800000 de cazuri noi anual [2]. Incidenta CHC crește progresiv cu avansare în vârstă atingând un maxim în jurul vârstei de 70 de ani [3]. Incidenta CHC prezintă o variație geografică importantă, cu cele mai ridicate rate de incidență în zona estică a Asiei (mai mult de 50% din cazuri par în China) și Africa sub-sahariană, reprezentând împreună aproximativ 85% din toate cazurile la nivel mondial [4]. În cazul Europei, incidența este mai redusă, cu excepția sudului Europei, unde incidența la bărbați (10,5 la 100000 rata de incidență standardizată în funcție de vârstă) este semnificativ mai mare [5].

Incidența CHC în România în 2012 se situa între 4,6 și 6 cazuri la 100 000 de locuitori, cu o rată a mortalității de 4.4 cazuri la 100.000 de locuitori. Cele mai frecvente cauze ale bolii hepatice în această regiune geografică sunt reprezentate de consumul de alcool în 46% din cazuri, infecția VHC în 29 % din cazuri, urmată de infecția cronică VHB (15%) [6].

Capitolul 2 prezintă factorii de risc pentru dezvoltarea cirozei hepatice și a carcinomului hepatocelular, investigați până în prezent. Cel mai important factor de risc pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular este reprezentat de ciroza hepatică în 60% până la 80% din cazuri [7]. În cazul prezentei cirozei hepatice, CHC este cel mai frecvent asociat etiologiei virale, urmată de cea etanolică și mult mai rar de hemocromatoză sau colangita biliară primitivă. Etiologia cirozei hepatice este extrem de diversă incluzând infecțiile virale cronice (virusurile hepatitice B, C, D), consumul de alcool, ficatul gras non-alcoolic (NAFLD), boli genetice și metabolice, anumite substanțe medicamentoase (ex: fenotiazină, fenitoină), precum și expuneri toxice dietetice (aflatoxine). Asocierea dintre consumul de alcool, infecții virale cronice sau alți factori (sindromul metabolic) au un efect sinergic de stimulare a inflamației hepatice. Incidenta anuală a CHC la pacienții cu ciroza hepatică variază de la 2-8%, cu o rată cumulată a incidenței la 5 ani variind de la 15% la 20% [8]. La nivel mondial, infecția cronică

cu virusul hepatitic B (VHB) reprezintă aproximativ 50% din totalul cazurilor noi de CHC [3]. Râsul estimat de dezvoltare a CHC este de 15-20 de ori mai mare la pacienții infectați cu VHB decât în populația neinfectată [3, 9]. La pacienții infectați cronic cu VHB factori de risc adiționali pentru dezvoltarea CHC sunt reprezentați de sexul masculin, etnie africană sau asiatică, istoric familial pozitiv pentru CHC, prezenta antigenului e (AgHBe), încărcătura virală mare, durata lungă a infecției, citoliza hepatică persistentă sau prezența genotipului C [10, 11, 12, 13].

Infecția cronică VHC este cel mai important factor de risc pentru CHC în țările occidentale [4]. Pacienții infectați cu VHC prezintă o creștere de 15 până la 20 de ori a riscului de a dezvolta CHC în comparație cu persoanele neinfectate [3, 14], riscul fiind mai mare la pacienții în stadiul de ciroză hepatică (risc anual 3% -5%). Alți factori de risc sunt genotipul 1b sau 3, vârsta înaintată, sexul masculin, asocierea cu diabetului zaharat sau obezitatea, consumul de alcool și coinfecția cu HIV sau VHB [9, 15, 16, 17].

Alcoolul este o cauză majoră de afectare hepatică la nivel mondial. Consumul de alcool în cantitate mare, definit ca un consum zilnic de trei sau mai multe băuturi alcoolice pe o perioadă îndelungată reprezintă un factor de risc clar pentru apariția CHC [18]. Aportul de alcool are de asemenea un efect sinergic asupra riscului de CHC la pacienții infectați cu VHB, VHC sau cei cu steatohepatita non-alcoolică prin accelerarea progresiei la ciroză hepatică [16,19].

În prezent, boala ficatului gras non-alcoolic a devenit una dintre principalele cauze de afectare hepatică cronică și un factor de risc frecvent întâlnit pentru apariția CHC [20, 21]. Creșterea riscului de apariție a CHC pare să apară în special la pacienții cu ficat gras non-alcoolic aflați în stadiul de ciroză însă acesta se poate dezvolta și în absența cirozei hepatice [22, 23]. În lipsa unor tratamente medicamentoase eficiente, singura soluție pentru ameliorarea ficatului gras non-alcoolic este reprezentată de modificarea stilului de viață și scăderea ponderală [24].

În continuare tot în cadrul capitolelor 2 sunt descrise patogeneza CHC și manifestările clinice la momentul prezentării pacienților. Dezvoltarea CHC în cazul pacienților infectați cu VHC apare ca rezultat al inflamației cronice asociată cu injurie hepatocitară ce conduce la apariția fibrozei hepatice cu progresie ulterioară spre ciroza hepatică. În cazul cirozei alcoolice injuria hepatică apare ca urmare a stresului oxidativ crescut, ce poate avea un efect pe căile de semnalizare importante pentru dezvoltarea CHC. Pe de altă parte infecția cronică cu VHB exercită și un efect oncogenic direct indiferent de prezența cirozei, prin integrarea genomului viral în nucleul celulei gazdă ducând la apariția de microdeleții și o alterare a

genelor de reglare a creșterii la nivelul ADN-ului hepatocitar. La pacienții cu boala ficatului gras non-alcoolic, se considera că o creștere a stresului oxidativ (ca rezultat al acumulării unui nivel ridicat de acizi grași intrahepatocitar) duce la injurie hepatică și dezvoltarea de mutații genetice ce vor duce ulterior la apariția neoplaziei [25].

Cele mai importante căi specifice pentru patologia tumorală hepatică sunt reprezentate de calea de semnalizare Wnt/ β -catenină și Hedgehog, implicate în dezvoltarea și diferențierea celulelor; calea RAS și PI3K/AKT/mTOR, precum și factorul de creștere epidermal, factorul de creștere asemănător insulinei și factorul de creștere a hepatocitelor, fiind implicate în proliferarea celulară dependentă de receptorul tirozin kinazei [26, 27].

În prezent, din ce în ce mai mulți pacienți sunt diagnosticați cu CHC într-un stadiu incipient, când sunt încă asimptomatici [28]. Simptomele ce apar doar în stadiile avansate, când tumora este voluminoasă și sunt reprezentate de durere la nivel hipocondru drept, scădere în greutate, sațietate precoce sau masă abdominală palpabilă.

Capitolul 3 se referă la metodele utilizate pentru supravegherea pacienților la risc de a dezvolta CHC. În contextul în care ciroza hepatică este în mod clar un factor de risc major pentru dezvoltarea CHC, o monitorizare corectă a celor cunoscuți cu boală hepatică cronică ar trebui să rezulte în creșterea probabilității de detectare precoce a CHC, posibilitatea unui tratament eficient și îmbunătățirea prognosticului. Strategia actuală pentru diagnosticul CHC în stadiul incipient este supravegherea periodică a pacienților cu risc crescut de dezvoltare a CHC, recomandare ce se regăsește în prezent în majoritatea ghidurilor internaționale [13,29].

Ultrasonografia abdominală și valoarea serică a AFP (singure sau combinate) sunt cele mai utilizate modalități de supraveghere pe scară largă însă sensibilitatea și specificitatea ne arată că aceste modalități sunt departe de a fi perfecte [30, 31]. Cu toate acestea, ultrasonografia are o acuratețe diagnostică acceptabilă atunci când este utilizată ca test de supraveghere cu o sensibilitate între 58 până la 89% și o specificitate ce depășește 90% [29].

Principalul dezavantaj al ultrasonografiei este legat de faptul că performanța sa depinde de experiența examinatorului și de calitatea aparatului folosit, iar realizarea unei examinări corecte și complete este dificilă de obținut în cazul pacienților obezi. Deși performanțele ultrasonografiei nu sunt ideale, aceasta este net superioară oricărui test sau combinație de teste serologice validate disponibile în prezent.

Tomografia computerizată (CT) este utilizată atunci când există suspiciunea prezentei unui CHC după examinarea ultrasonografică la un pacient cu ciroză hepatică. Utilizarea CT ca singura metodă imagistică a dus la o sensibilitate în detectarea CHC de până la 100% pentru tumorile cu o dimensiune mai mare de 2 cm, 93% în cazul tumorilor de 1-2 cm și de

60% în cazul tumorilor cu dimensiuni mai mici de 1 cm [32]. În practică curentă se utilizează CT pentru supraveghere doar în cazul persoanele cu obezitate semnificativă sau în cazul în care există un nodul suspect ecografic în prezența unor valori crescute ale AFP seric.

Imagistica prin rezonanță magnetică a ficatului are o sensibilitate de 40-70% pentru detectarea CHC precoce [33]. Leziunile mai mari de 1 cm care au aspect hiperintens în faza T2 a examinării sunt susceptibile de a fi maligne, acest lucru ajutând la diferențierea de leziunile nodulare displazice sau de regenerare care au un aspect hipointens în T2 [34]. Astfel examenul RMN este un instrument util pentru diagnosticarea CHC, însă această modalitate este costisitoare, cu o sensibilitate scăzută nefiind ideală pentru supraveghere.

Diferite teste serologice au fost evaluate sau sunt încă în curs de evaluare pentru diagnosticul precoce a CHC incluzând: alfa-fetoproteina (AFP), des-gamma-carboxi protrombină (PIVKA) - de asemenea cunoscută ca protrombina indusă de vitamina K (PIVKA), fracțiunea glicozilata a AFP (AFP L3). De la descoperirea sa în anul 1963 și asocierea recunoscută cu prezența CHC [35], valoarea AFP a devenit testul serologic cel mai frecvent utilizat atât pentru screeningul cât și pentru diagnosticul hepatocarcinomului la pacienții cu ciroză hepatică. Utilizând curba ROC pentru AFP, un nivel seric normal este considerat sub 10ng/ml și asigură un raportul optim între sensibilitate și specificitate. O valoare de peste 20ng/ml poate fi considerată limita superioară peste care sunt necesare investigații pentru excluderea CHC [36]. Creșteri tranzitorii și fluctuații ale valorilor AFP pot apărea în bolile hepatice cronice și ciroza în special în timpul puseelor de replicare virală ceea ce contribuie la o specificitate relativ scăzută a acestui biomarker [37]. AFP total poate fi separat în trei glicoforme diferite, și anume AFP-L1, AFP-L2 și AFP-L3, în funcție de capacitățile lor de legare de lectina lens culinaris (LCA). Frațiunea AFP-L3, este legată de LCA și este glicoforma majoră a AFP în serul de CHC. Măsurarea AFP-L3 a fost dezvoltat pentru a îmbunătăți sensibilitatea AFP și iar studii inițiale au arătat că măsurarea AFP-L3 ar putea fi utilă pentru detecția precoce a CHC la pacienții cu ciroză hepatică și acest test ar putea fi utilizat ca test de screening [38,39]. Studii ulterioare au arătat însă faptul că AFP-L3 nu este util în diagnosticul precoce al CHC din cauza sensibilității scăzute și a necesității prezentei unor valori ridicate ale AFP total ce limitează eficiența testului [40].

Nu există un consens în ceea ce privește intervalul optim pentru supraveghere însă ghidurile actuale recomandă un interval de supraveghere de 6 luni [13, 29]. În cele din urmă, selectarea pacienților eligibili pentru supraveghere rămâne un subiect în dezbatere. Decizia de a începe supravegherea trebuie să depindă de riscul de apariție a CHC, corelat practic cu incidența CHC în populația respectivă.

Capitolul 4 se referă la metodele utilizate pentru diagnosticul carcinomului hepatocelular. CHC este în cele mai multe situații diagnosticat prin metode neinvazive. Pentru leziuni mai mari de 2 cm apărute pe fond de ciroza hepatică, diagnosticul de CHC se stabilește folosind criteriile EASL prezența captării arteriale precoce cu spălare (wash-out) în faza venoasă la examenul CT sau RMN dinamic [29]. Pentru leziuni de 1-2 cm diagnosticul se face folosind aspectul imagistic tipic la una sau două modalități imagistice diferite. Pentru leziunile mai mici de 1 cm acestea necesită urmărire imagistică la 3 luni pentru a evidenția o modificare a dimensiunii sau a apariția unor elemente imagistice noi caracteristice [41]. La pacienții cu leziuni mai mari de 1 cm cu aspect imagistic neconcludent ghidurile EASL sugerează efectuarea biopsiei hepatice.

Criteriile imagistice utilizate în cadrul examenelor dinamice CT și RMN au fost validate pentru noduli cu diametru de peste 1 cm cu o specificitate și o valoare predictivă pozitivă de aproape 100% [42]. Cu toate acestea, până la o treime din pacienții cu CHC nu pot fi diagnosticați folosind doar examene imagistice, fiind necesare teste invazive cum ar fi biopsia hepatică [43]. Biopsia nodulilor hepatici poate duce la rezultate fals negative la până 40% din cazuri în special în cazul tumorilor de mici dimensiuni (1-2 cm), în aceste cazuri examinarea anatomopatologică pentru diferențierea nodulilor displazici de CHC poate fi dificil de interpretat.

Diagnosticul anatomopatologic se bazează pe definițiile grupului internațional de consens pentru CHC [44]. Caracteristicile histologice ale unui CHC bine diferențiat sunt reprezentate de creșterea densității celulare, creșterea raportului nucleu/citoplasmă, existența unui pattern trabecular neregulat, evidențierea de spații porte în cadrul nodulului, apariția unui model pseudoglandular sau prezența de arteriole aberante [45].

Capitolul 5 prezintă sistemul de stadializare al carcinomului hepatocelular, cu implicațiile sale terapeutice. O clasificare eficientă a CHC ar trebui să fie utilă pentru alegerea metodei terapeutice optime și, de asemenea, să dea o estimare a prognosticului. Sistemele de stadializare sunt disponibile pentru majoritatea neoplaziilor, cum ar fi clasificarea TNM, însă pentru CHC acest sistem standard nu este util pentru că nu ia în considerare boala hepatică de bază și statusul de performanță al pacientului. Evaluarea extensiei extrahepatice și prezența adenopatiilor sunt detectate printr-un examen CT sau RMN, iar scintigrafia este cea mai utilizată metoda pentru a evalua prezența metastazelor osoase.

Pentru stadializarea CHC au fost dezvoltate mai multe sisteme de scor specifice de evaluare a prognosticului însă, chiar dacă nu este un consens absolut universal, cea mai utilizată clasificare este clasificarea Barcelona (BCLC), aceasta stratificând pacienții în

grupuri cu diferite indicații de tratament, în funcție de extensia tumorii, stadiul bolii hepatice de bază și statusul de performanță [46]. Această clasificare a fost validată pe scară largă, fiind clasificarea recomandată în prezent de către ghidurile actuale de practică clinică atât europene cât și americane [50, 47].

Stadiul inițial (BCLC 0/A) include pacienții cu CHC unic cu diametru mai mic de 2 cm (BCLC 0) sau până la 3 nodul de CHC cu diametru maxim de 3 cm (BCLC A), cu funcție hepatică conservată (Child-Pugh A/B) și status de performanță 0. Supraviețuire la 5 ani a pacienților cu tumori BCLC 0 și A, tratați curativ, este între 80-90% și respectiv 50-75% [48]. Rezecția chirurgicală reprezintă terapia de prima alegere la acest grup de pacienți, iar celor cu tumori mai mici de 2 cm care nu sunt candidați pentru chirurgie din cauza morbidităților li se recomanda ablația percutană. În cazul pacienților cu tumori non-rezectabile din cauza prezenței hipertensiunii portale sau a tumorilor multiple soluția terapeutică recomandată este transplantul hepatic.

Stadiul intermediar (BCLC B) Pacienții din acest grup prezintă o funcție hepatică bună și un status de performanță conservat (Child-Pugh A-B PS-0) și au tumori nerezecabile fără invazie macrovasculară (tromboză malignă a venei porte) sau extensie extrahepatică. Pentru acești pacienți, în cele mai multe cazuri nu mai este posibilă o terapie curativă, iar tratamentul recomandat este chemoembolizarea transarterială (TACE), Rata medie de supraviețuire în studiile inițiale la pacienți tratați prin TACE a fost de aproximativ 24 de luni [49], însă odată cu îmbunătățirea selecției pacienților și a tehnicilor noi apărute, supraviețuirea medie ajunge și la 4 ani [50].

Stadiu avansat (BCLC C) Acest grup include pacienții ce prezintă un status de performanță modificat (PS 1-2), funcție hepatică conservată Child-Pugh A-B și/sau invazie macrovasculară sau diseminare extrahepatică. Fără tratament supraviețuirea medie în acest grup este de 6-8 luni [51]. Progresele în cunoașterea modificărilor moleculare ale CHC au permis dezvoltarea mai multor agenți terapeutici, cel mai utilizat agent sistemic care a demonstrat că îmbunătățește supraviețuirea pacienților cu CHC fiind molecula de Sorafenib [52].

Stadiul terminal (BCLC D) Ultimul stadiu al clasificării include pacienți cu ciroza hepatică decompensată și/sau status de performanță sever alterat (Child-Pugh C și PS 3-4), indiferent de caracteristicile tumorii. În acest stadiu este indicat tratament simptomatic, supraviețuirea medie a acestor pacienți, nedepășind 4 luni [53].

Tema capitolului 6 este reprezentată de tratamentul carcinomului hepatocelular. Modalitățile de tratament utilizate astăzi variază în funcție de stadiul CHC și de severitatea bolii hepatice subiacente.

Rezecția chirurgicală este modalitatea terapeutică de elecție la pacienții cu CHC dezvoltat în absența cirozei hepatice și la pacienții atent selecționați cu ciroză hepatică stadiul Child-Pugh A, fără hipertensiune portală. Din cauza prevalenței ridicate a cirozei hepatice, rezecția chirurgicală este efectuată la aproximativ 5% din pacienții cu CHC din țările vestice însă la până la 40% în pacienții asiatici unde este endemica infecția cu VHB și multe cazuri de CHC sunt diagnosticate în absența cirozei hepatice [54].

Transplantul hepatic a evoluat în ultimele decenii și este în prezent considerat opțiunea terapeutică optimă pentru pacienții diagnosticați CHC greșit pe fondul de ciroză hepatică. Avantajul transplantului hepatic comparativ cu rezecția este acela că se înlătură nu doar leziunea tumorală, ci se elimină practic și afecțiunea hepatică de fond astfel reducându-se substanțial riscul de recurență. Criteriile utilizate cel mai frecvent pentru indicația de transplant hepatic la pacienții cu CHC au fost inițial propuse de către Mazzafero și colab. În 1996 și sunt cunoscute în mod obișnuit drept criteriile Milano, acestea asigurând o rată de supraviețuire la 4 ani de peste 70%, cu o rată de recurență de sub 15% [55]. Transplantul cu ficat de la donator viu pentru CHC s-a dezvoltat ca o alternativă acceptabilă la transplantul cadaveric în ultimele decenii din cauza lipsei organelor, creșterea timpului de așteptare și faptului că mulți pacienți listați pentru transplant vor deceda în așteptarea unui organ adecvat. Transplantul cu ficat de la donator viu rămâne însă o procedură complexă care este asociată cu o morbiditate de 20 - 40% și o mortalitate a donatorului de 0,3 - 0,5% [56]. Din păcate în multe țări cum este și cazul României rata de donare de la cadavru este relativ redusă. În aceasta situație, transplantul de la donator viu poate oferi singură șansă de vindecare pentru mulți pacienți cu CHC. Rolul comisiei de etică este de a se asigura întotdeauna ca acest gest este un cadou dezinteresat și nu există coerciție sau angajamente financiare.

Ablația tumorală ghidată imagistic este în prezent, conform ghidurilor, tratamentul recomandat pentru nodulii de CHC cu diametru mai mic de 3 cm [29]. Ablația induce necroza tumorală fie prin injectarea de substanțe chimice, (alcool) fie modificarea temperaturii locale prin radiofrecvență, microunde sau crioablație. Majoritatea acestor proceduri sunt efectuate prin abordare percutană.

Injectarea percutană de etanol, introdusă în încă din anii 1980, a fost prima metodă utilizată cu o supraviețuirea este de 50% la 5 ani însă cu o rată crescută de recidivă de până la 43%. Ablația prin radiofrecvență (RFA) este o tehnică termo-ablative, ce determină creșterea

temperaturii prin aplicarea de curent alternativ de înaltă frecvență prin electrozi plasați intra-tumoral, a evoluat rapid și este considerată potențial curativă pentru CHC de mici dimensiuni. RFA poate fi aplicată atât după laparotomie cât și percutanat sub ghidaj ecografic. Ghidurile actuale de tratament a CHC considera că leziunea tumorală nu ar trebui să depășească 3 cm în diametru pentru a atinge cele mai bune rate de ablație completă [29]. Mai recent se afla în curs de evaluare clinică o tehnică nouă, non-chimică, non-termică, pentru tratamentul nodulilor de CHC cu diametru sub de 3 cm numită electroporație ireversibilă. Această modalitate are capacitatea de a delimita clar țesutul tratat de cel netratat și se pare că se poate realiza o ablație completă în vecinătatea vaselor fără a afecta funcționalitatea acestora [57]. Cu toate beneficiile potențiale ale acestei noi tehnici sunt necesare studii suplimentare pentru determinarea eficienței sale în practică clinică curentă.

Embolarizarea transarterială (TAE) este o modalitate paliativă de terapie loco-regională a CHC în situația în care nu este posibilă o terapie curativă, la pacienți cu funcție hepatică conservată și fără invazie vasculară sau extensie malignă extrahepatică. Principiul acestei metode se bazează pe faptul că CHC este vascularizat doar prin ramuri ale arterei hepatice ce pot fi embolizate și astfel se obține necroza țesutului tumoral. Când se asociază o substanță citotoxică cu lipiodol și un agent de embolizare atunci este denumită chemoembolizare transarterială (TACE) [58]. Ratele de răspuns la TACE variază între 16 - 60%, însă mai multe studii și o meta-analiză comparând TACE cu un lot control a demonstrat o ameliorare relativ modestă a supraviețuirii cel mai probabil cauza de stadiul relativ avansat al afecțiunii hepatice de fond [59, 60]. Factori de prognostic favorabil la pacienții tratați prin TACE sunt reprezentați de tumora unică, diametru sub 5 cm, valoarea serică a AFP < 20ng/mL și afectare unilobară [61].

Chimioterapia sistemică s-a dovedit a fi utilă doar în cazul unui număr mic, selectat de pacienți ca o opțiune paliativă. Răspunsul la terapie este limitat și în relație cu stadiul afectării hepatice de bază. Trialul SHARP a raportat un beneficiu modest, dar semnificativ statistic de supraviețuire pentru pacienții cu CHC avansat tratați cu un antagonist al RAF-kinazei/VEGF-2, denumit Sorafenib [62].

De asemenea tot în cadrul aceluiași capitol se prezintă și evaluarea răspunsului la tratament și prognosticul carcinomului hepatocelular. După aplicarea oricărei modalități de tratament este necesar evaluarea răspunsului terapeutic. În cazul rezecțiilor chirurgicale, dacă apare recurența tumorii putem avea două situații: recurența precoce în primii doi ani după tratament și recurența tardivă după doi ani, când se poate considera că este apariția unei leziuni de novo.

Recurenta precoce se datorează de obicei prezenței ca factori de risc a invaziei microvasculare, a leziunilor satelit, a mai multor noduli tumorali sau unei leziuni prost diferențiată histologic [63], în timp ce recurența tardivă depinde în mare măsură de procesul de carcinogeneza în cadrul bolii hepatice de bază.

Evaluarea răspunsului la pacienții tratați prin ablație sau TACE se face folosind criteriile mRECIST (*Modified Response Evaluation Criteria în Solid Tumors*). Modificarea criteriilor originale RECIST [64] a fost necesară din cauza faptului că mai multe terapii pentru CHC duc la apariția necrozei tumorale, acest fenomen nefiind întotdeauna însoțit de reducerea dimensiunii tumorii. Prin urmare, noile criterii iau în considerare prezența sau absența țesutului tumoral viabil și nu reducerea dimensională a leziunii tumorale. Prezența țesutului tumoral viabil este evaluată folosind tehnici radiologice dinamice, cum ar fi CT și RMN, și este definită prin captarea de contrast în faza arterială. Evaluare răspunsului la terapiile antiangiogenice cum ar fi cea cu sorafenib, nu poate fi efectuată utilizând aceste criterii în acest scop utilizându-se criteriile BCLC RECIST (BCLC-refined RECIST) [65].

Capitolul 7 expune motivația nevoii de noi biomarkeri pentru caracterizarea carcinomului hepatocelular și trece în revista biomarkerii evaluați în cadrul tezei de doctorat. Cu toate că au fost înregistrate progrese, diagnosticul în mod adecvat, în stadii incipiente al CHC s-a dovedit a fi dificil, iar răspunsul individual la terapie nu poate fi prezis în prezent nici chiar în cazul pacienților la care dispunem de evaluarea histologică a tumorii hepatice. Un pas important în cercetarea actuală a CHC consider că este reprezentat de identificarea unor noi markeri biologici cu o sensibilitate și specificitate ridicată care să fie utilizați pentru un diagnostic precoce a CHC, precum și pentru predicția prognosticului și la selectarea celei mai bune opțiuni de tratament în cazul fiecărui pacient.

Biomarkerul ideal ar trebui să fie ușor de măsurat, cu un cost redus, iar testul să fie reproductibil, minim invaziv și cu un nivel crescut de acceptabilitate atât pentru pacient, cât și pentru medic [66].

Markeri serologici propuși pentru diagnosticul CHC sunt protrombină indusă de absența vitaminei K (PIVKA) și glipican 3 (GPC-3). Cu toate acestea, nici unul dintre aceștia nu a fost validat ca test de diagnostic pentru CHC. Acești biomarkeri serici vor fi discutați în continuare.

PIVKA este o protrombină anormală, inactivă, deficientă în acid γ -carboxiglutamic, aceasta a fost raportată a fi un factor de creștere ce stimulează expresia factorilor de creștere angiogenici în celulele de CHC fapt care sugerează rolul său în progresia tumorală [67]. Mecanismele implicate în sinteza PIVKA sunt incomplet elucidate până în prezent. Mai multe

studii au demonstrat faptul că PIVKA este produs nu doar în țesutul tumoral ci și în țesuturile non-tumorale din jur și chiar și cazul unor patologii hepatice benigne, cum ar fi hepatitele acute sau cronice [68, 69]. CHC este în principal o tumoră hipervasculară, iar progresia invaziei și a metastazelor este strâns corelată cu procesul de angiogeneza. Un studiu comparativ a arătat că nivelurile plasmatice ridicate ale PIVKA s-au corelat strâns cu densitatea microvasculară intratumorală și dimensiunea tumorală. Analize imunohistochimice au indicat faptul că nivelurile PIVKA au fost semnificativ crescute în țesuturile hipervasculare de CHC comparativ cu țesuturile CHC hipovasculare [70].

Alături de AFP și AFP-L3, PIVKA este unul dintre markeri cei mai utilizați pentru diagnosticul CHC în special în populațiile asiatice. În plus, acești markeri sunt utilizați deasemenea pentru monitorizarea răspunsului la tratament și recurența tumorii.

Niveluri crescute ale PIVKA a fost asociat cu dimensiunea tumorală a CHC. Recurența tumorală post terapie și metastazarea sunt mai frecvent observate la pacienții cu valori pozitive pentru PIVKA decât la pacienții cu valori nedetectabile ale acestui marker. AFP a fost considerat inițial un marker ideal pentru diagnosticul CHC din anii 1960, putând fi utilizat și pentru monitorizarea eficacității și recurenței post tratament a CHC. Studii anterioare au arătat că asocierea de doi sau trei biomarkeri pentru diagnosticul CHC ar putea îmbunătăți considerabil sensibilitatea și acuratețea diagnostică.

Alături de AFP, PIVKA este un marker excelent pentru monitorizarea eficacității tratamentului așa cum am demonstrat și în cadrul acestei teze, modificările acestuia corelându-se cu distrugerea celulelor tumorale după tratament curativ și ulterior cu apariția recurenței. Întrucât valoarea PIVKA și AFP au o dinamică independentă una față de cealaltă la pacienții cu CHC și nici unul nu este un marker ideal pentru CHC, mai mulți autori au demonstrat clar faptul că asocierea celor doi biomarkeri crește atât sensibilitatea cât și specificitatea pentru diagnosticul serologic al CHC [71, 72].

Termenul de glipican a fost atribuit unei familii de proteoglicani cu heparin sulfat ce sunt atașați la membrana celulară de către o ancoră de glicozil-fosfatidilinozitol. Glipican-3 (GPC3) este puternic exprimată la nivelul celulelor de CHC dar și la nivelul altor celule tumorale în special în cazul melanomului. Moleculele de glipican joacă un rol important în creșterea celulelor, diferențierea și în motilitatea celulară [73].

CHC și colangiocarcinomul (CCA) sunt cele două forme majore ale cancerului hepatic, iar GPC3 este exprimat în CHC, dar nu și în CCA sau în țesutul hepatic normal, astfel că poate fi considerat pentru a fi evaluat ca un nou marker tumoral pentru CHC. GPC3 este puternic exprimat la peste 70 % dintre pacienții cu CHC dar nu și în țesuturile hepatice non-

tumorale [74]. Ca urmare a constatării că pacienții cu CHC pozitivi pentru GPC3 au o rată de supraviețuire semnificativ mai mică la 5 ani decât pacienții cu CHC GPC3 negativi, prezenta GPC3 este corelată cu un prognostic prost la acești pacienți [75].

Valori crescute ale GPC3 dar și AFP au fost raportate însă și la pacienții cu tumori germinative testiculare [76]. În condițiile în care sensibilitatea GPC3 ca biomarker la pacienții cu CHC este dezamăgitoare iar lucrări nou publicate arata niveluri ridicate și în alte malignități [77], Este clar faptul că studii suplimentare sunt necesare pentru a valida utilitatea sa ca instrument de diagnostic.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Capitolul 8 descrie ipotezele de lucru și obiectivele generale ale cercetării. În ianuarie 2016 a debutat proiectul de studiu multicentric numit "Markeri imagistici, serologici și imunohistochimici cu rol în diagnosticul și prognosticul carcinomului hepatocelular", parte a acestui proiect fiind și prezenta teza de doctorat. Scopul acestui studiu este de a face o secțiune transversală privind prevalența CHC și de a evalua stadiul în care se stabilește diagnosticul, rolul diferitelor mijloace de diagnostic inclus evaluare unor noi biomarkeri, stabilirea valorii unor asocieri de mijloace, implicațiile privind opțiunile terapeutice și valoarea prognostică a diferitelor scoruri deja utilizate și eventual dezvoltarea unui scor nou de prognostic.

Dincolo de aceste obiective pe termen scurt sau mediu, acest studiu va deschide oportunitatea de a realiza o bancă de produse biologice (ser, plasmă, țesut) pentru studii ale markerilor serologici, metabolomică, proteomică, ADN seric și tisular, microARN.

Pacienții ce fost incluși în teza de față sunt doar cei diagnosticați și tratați în cadrul secției de Gastroenterologie și Hepatologie III a Institutului Clinic Fundeni, unde managementul acestor cazuri se realizează de către o echipă multidisciplinară, incluzând gastroenterologi, oncologi, chirurghi și radiologi.

Astfel a fost construită o bază de date, într-o foaie de calcul tabelar, pe un server securizat și au fost introduse variabilele clinice, epidemiologice, patologice și radiologice. Toate opțiunile terapeutice au fost înregistrate, ca și toate procedurile invazive de diagnostic (biopsie) în cazul în care au fost efectuate. S-a plecat de la dorința de a realiza o caracterizare detaliată și o înțelegere mai aprofundată a acestei populații complexe de pacienți, cu aplicații potențiale în diagnosticarea precoce și îmbunătățirea tratamentului și a prognosticului. Un astfel de registru nu a fost realizat până acum în România. Pacienții au fost monitorizați pe toată perioada studiului sau până la momentul decesului.

Obiective generale

- Identificarea rolului biomarkerilor în diagnosticul, urmărirea și prognosticul carcinomului hepatocelular la un lot de pacienți diagnosticați în cadrul unui centru terțiar de gastroenterologie, hepatologie și transplant hepatic din România
- Corelarea valorii serice a biomarkerilor cu diagnosticul, stadiul clinic și răspunsul terapeutic și implicit prognosticul pacienților cu carcinom hepatocelular.

- Crearea unei baze de date ușor de folosit de către utilizatori care să includă informații relevante despre toți pacienții și despre leziunile tumorale ale acestora pentru a putea stadializa corect fiecare pacient și pentru a putea corela aceste caracteristici cu modalitățile terapeutice folosite și prognosticul acestora.

Capitolul 9 prezintă metodologia generală a cercetării. S-a efectuat un studiu observațional, prospectiv pe un număr total de 168 de pacienți diagnosticați cu carcinom hepatocelular ce au efectuat chemoembolizare transarterială ca modalitate inițială de tratament în cadrul Institutului Clinic Fundeni în perioada ianuarie 2014 - decembrie 2018. Criteriile de includere în studiu au fost: vârsta peste 18 ani, pacienți nou diagnosticați cu carcinom hepatocelular, pe baza rezultatelor histologice sau a caracteristicilor tipice de imagistică, fără indicație pentru rezecție chirurgicală sau au refuzat intervenția chirurgicală ca metoda de tratament inițială, internare în clinică în perioada de desfășurare a studiului și semnarea consimțământului informat. Pentru studiul ce a evaluat utilitatea diagnostică a biomarkerilor am inclus un număr total de 182 de pacienți. Astfel 116 pacienți diagnosticați cu carcinom hepatocelular și 66 de pacienți cu ciroza hepatică (grup de control) au fost înrolați în perioada martie 2016 - decembrie 2018.

Protocol de studiu

Recrutarea pacienților pentru acest proiect a fost începută în luna ianuarie 2014 după ce a primit aprobarea etică oficială din partea comisiei de etică a Institutului Clinic Fundeni. Colectarea și înregistrarea datelor s-au realizat prospectiv, în perioada ianuarie 2014 - decembrie 2018, de la pacienți cu diagnostic imagistic sau/și histologic de carcinom hepatocelular, cu domiciliul în România și internați în cadrul secției de Gastroenterologie și Hepatologie III, Institutul Clinic Fundeni.

Prezența carcinomului hepatocelular a fost diagnosticat pe baza caracteristicilor imagistice tipice în conformitate cu recomandările EASL (Asociația Europeană pentru Studiul Ficatului), iar pacienții au fost apoi stadializați conform clasificării Barcelona, iar statusul de performanță a fost evaluat la fiecare pacient.

Diagnosticul de ciroza hepatică a fost stabilit folosind una sau mai multe elemente clinice sau imagistice sugestive pentru prezența hipertensiunii portale. De asemenea au fost utilizate și metode serologice neinvazive (FibroMax - Biopredictive) sau elastografice (Fibroscan). Toți pacienții cu ciroza hepatică incluși în grupul de control au fost supuși unei examinări imagistice de înaltă rezoluție pentru a exclude prezența carcinomului hepatocelular. Protecția și confidențialitatea datelor au fost respectată în conformitate cu declarația de la Helsinki și cu legislația română actuală privind protecția datelor cu caracter personal.

Toți pacienții au efectuat analize uzuale (hematologie și biochimie completă, grup sanguin, coagulograma), examen ultrasonografic, examinare CT și endoscopie digestivă superioară pentru evaluarea varicelor esofagiene.

Toate procedurile de chemoembolizare au fost efectuate în centrul nostru de către doi medici experimentați în radiologie intervențională. Evaluarea răspunsului radiologic utilizând CT sau RMN și a răspunsul markerilor tumorali au fost efectuate la 4-6 săptămâni după procedură de chemoembolizare. Toți pacienții incluși în studiu au fost evaluați în conformitate cu criteriile modificate de evaluare a răspunsului în tumorile solide (mRECIST).

Dacă a fost identificat țesut tumoral viabil prin examen CT sau RMN, o nouă procedura de chemoembolizare a fost efectuată. În cazul în care s-a obținut lipiodolizare compactă și nu a fost identificat țesut tumoral viabil restant a fost considerat răspuns complet. Evaluarea radiologică și determinarea markerilor tumorali s-a efectuat la fiecare 3 luni pentru a evalua recurența sau progresia carcinomului hepatocelular. La momentul decelării recidivei tumorale s-a recoltat o nouă proba biologică pentru evaluarea markerilor tumorali studiați.

Recoltarea probelor de sânge a fost efectuată de o echipă de asistenți medicali calificați din cadrul secției Gastroenterologie III a Institutului Clinic Fundeni. De la fiecare pacient inclus au fost recoltate două eprubete de recoltare biochimie și trei eprubete cu EDTA. Plasma obținută de la fiecare probă sânge post centrifugare, a fost alicotată în microtuburi Eppendorf® și păstrată la -80 ° C până la determinarea biomarkerilor. La pacienții ce au efectuat transplantat hepatic, probe de țesut tumoral și din parenchimul non-tumoral au fost stocate pentru studii ulterioare.

Datele colectate de la subiecți au fost introduse atât online cât și într-o bază de date OpenOffice Calc versiunea 4.1.1 Copyright © 2014 The Apache Software Foundation. Analiza statistica s-a făcut cu ajutorul programului R versiunea 3.5.3. Valorile serice ale AFP, AFP L3, PIVKA și GPC3 au fost determinate prin tehnica ELISA.

Prezentare rezultatelor obținute a fost concepută sub formă a 4 studii distincte în care au fost incluși pacienți din baza de date concepută pentru realizarea tezei de față.

Capitolul 10 detaliază rezultatele statistice obținute în primul studiu al cercetării doctorale în urma analizării factorilor predictivi pentru răspuns post chemoembolizare și pentru supraviețuirea generală la pacienții tratați prin chemoembolizare transarterială (TACE). Este cuprinsă aici și secțiunea de discuții, ce compară datele obținute cu altele din literatura de specialitate. Această metodă paliativă de terapie loco-regională este utilizată la peste 70% din pacienții cu CHC, fiind cea mai frecvent folosită terapie și în clinica noastră. Un număr total 168 de pacienți au îndeplinit criteriile pentru includere în acest studiu și au fost tratați

prin TACE ca prima metodă terapeutică. Vârsta medie a fost de $62,2 \pm 8,02$ ani. Sexul masculin a predominat cu 115 pacienți (68,4%). Optzeci și trei de pacienți au avut un nivel AFP > 20 ng/ml. Mediana diametrului maxim al nodulilor tumorali a fost de 35 mm (interval, de la 10 la 120 mm).

Treizeci și nouă de pacienți (23,2%) au avut o singură leziune tumorală cu diametrul de până la 30 mm. La acei pacienți, tratamentul prin ablație prin radiofrecvență a fost imposibil din cauza localizării tumorii: lângă un vas de calibru mare în cazul a 8 pacienți (4,76%), la nivelul domului hepatic la 6 pacienți (3,6%), în proximitatea hilului hepatic la 5 pacienți (2,9%), iar 20 de pacienți (11,9%) au avut trombocitopenie importantă ($<70000/\text{mm}^3$).

Cea mai frecventă cauză a cirozei a fost infecția cu virusul C ($n = 98$, 58,3%). Valoarea mediană a bilirubinei totale, INR și MELD, a fost de 1,3 mg/dl (interval 0,3 până la 3,8 mg/dl), 1,2 (interval 0,9-2,1) și 9 (interval 6-17) respectiv. Șaizeci de pacienți (35,7%) au avut un CHC multinodular. Șaptesprezece pacienți au prezentat tromboză a venei porte (10,1%). Un număr de 17 pacienți (10,1%) au prezentat tromboza venei porte.

Perioadă mediană de urmărire a fost de 26 luni (interval de la 4 până la 62 de luni). Cea mai frecventă cauză a cirozei a fost infecția cu virusul C ($n = 98$, 58,3%). Șaizeci de pacienți (35,7%) au avut un CHC multinodular.

În continuare am analizat factorii predictivi pentru obținerea răspunsului complet post TACE. Dintre cei 168 de pacienți cu CHC tratat, un număr de șaizeci și trei de pacienți (37,5%) au obținut răspuns complet după TACE.

În analiza univariată, s-a observat că o valoare crescută a concentrației serice a AFP (> 22 ng/ml), absența criteriilor Milano, prezența nodulilor multipli, prezența unui nodul peste 5 cm în diametru se asociază cu absența obținerii unui răspuns complet. Predictorii independenți au fost dimensiunea tumorii (> 5 cm), multinodularitatea și o valoare crescută a AFP. Aceștia s-au corelat semnificativ statistic în cadrul analizei multivariate cu absența răspunsului complet post TACE.

Din totalul de 63 de pacienți cu răspuns complet, 55 de pacienți au avut o dimensiune a tumorii ≤ 5 cm, iar doar 8 pacienți (12,69%) au avut o tumoră cu un diametru > 5 cm. Cincizeci și unu de pacienți (80,9%) au prezentat nodul unic și 12 pacienți (19%) au prezentat noduli tumorali multipli.

Pentru un sublot de 71 de pacienți a fost analizat impactul asupra supraviețuirii și a răspunsului la embolizare, a valorii inițiale a biomarkerilor AFP-L3, PIVKA și GPC3. Pentru analiza de supraviețuire s-a folosit o regresie Cox, și s-a observat că o valoare inițială

crescută a PIVKA este un predictor independent al lipsei obținerii unui RC post TACE în urma analizei multivariate. Rata de concordanță a fost de 0.74 iar valoarea R^2 a fost de 0.095.

Recurența CHC a fost diagnosticată la 37 pacienți (58,3%) dintre cei 63 de pacienți ce au obținut răspuns complet. După obținerea răspunsului complet, perioada mediană de urmărire până la apariția recurenței a fost de 12 luni (interval, 5 până la 24 de luni). Au existat 32 de recidive locale (86,4%) și 5 leziuni tumorale la distanță (13,5%).

În analiza univariată, multinodularitatea și nivelul crescut al AFP seric (> 25 ng/ml) au fost asociate cu recurența CHC după RC indusă de TACE. În analiza multivariată, AFP seric a crescut (> 25 ng/ml) și multinodularitatea au fost semnificativ asociate cu recurența tumorii după obținerea unui răspuns complet inițial.

Rata recurenței în cazul pacienților cu noduli multipli (11/12 pacienți) a fost crescută comparativ cu pacienții având nodul tumoral unic (26/51 pacienți) (91,6% față de 50,9%, $p = 0,02$). La pacienții cu un nivel crescut de AFP seric (> 25 ng/ml) (18/23 pacienți), s-a observat o rată de recurență crescută față de pacienții cu nivel al AFP seric normal (≤ 20 ng/ml) (19/40 pacienți) (78,2% față de 47,5%, $p = 0,03$).

Din cei 168 de pacienți tratați prin TACE și incluși în studiu inițial 75 de pacienți (44.64%) au decedat în timpul perioadei de urmărire (ianuarie 2014-decembrie 2018). Rata globală de supraviețuire cumulativă la 1 și 2 ani a populației de studiu a fost de 88,5%, respectiv 62,8% (Fig.1.). Rata de supraviețuire la 2 ani, la femei a fost mai mare decât la bărbați (78.26% vs. 57.14%) însă nu a fost semnificativă statistic. Nu au existat diferențe semnificative de supraviețuire între diversele etiologii ale cirozei hepatice în lotul nostru.

A fost observată o diferență semnificativă între supraviețuirea pacienților ce au prezentat un nodul unic la momentul diagnosticului comparativ cu cei cu noduli multipli. Astfel supraviețuirea generală la 24 de luni a fost de 70.18% pentru cei cu nodul unic și doar de 25.00% la cei cu CHC multicentric (Fig.2.). Un număr de 11 pacienți (17,4%) au efectuat transplant hepatic după obținerea răspuns complet post TACE.

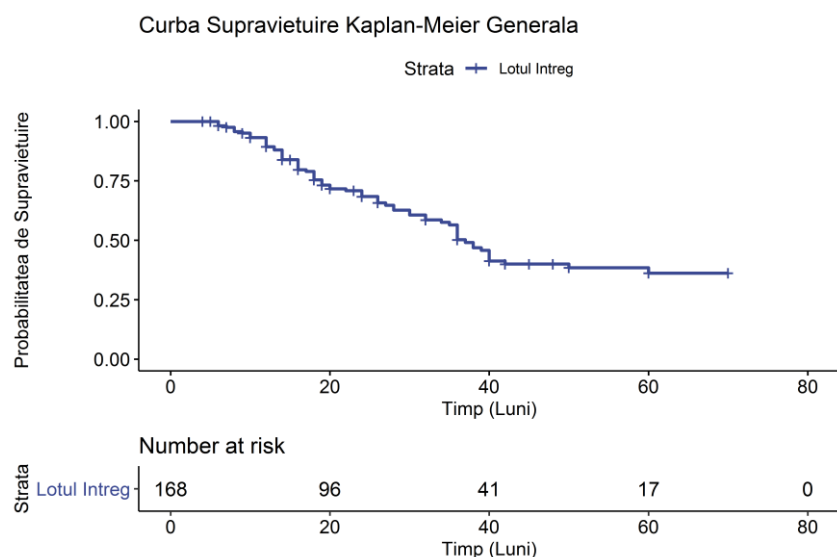


Fig.1. Supraviețuire Generală

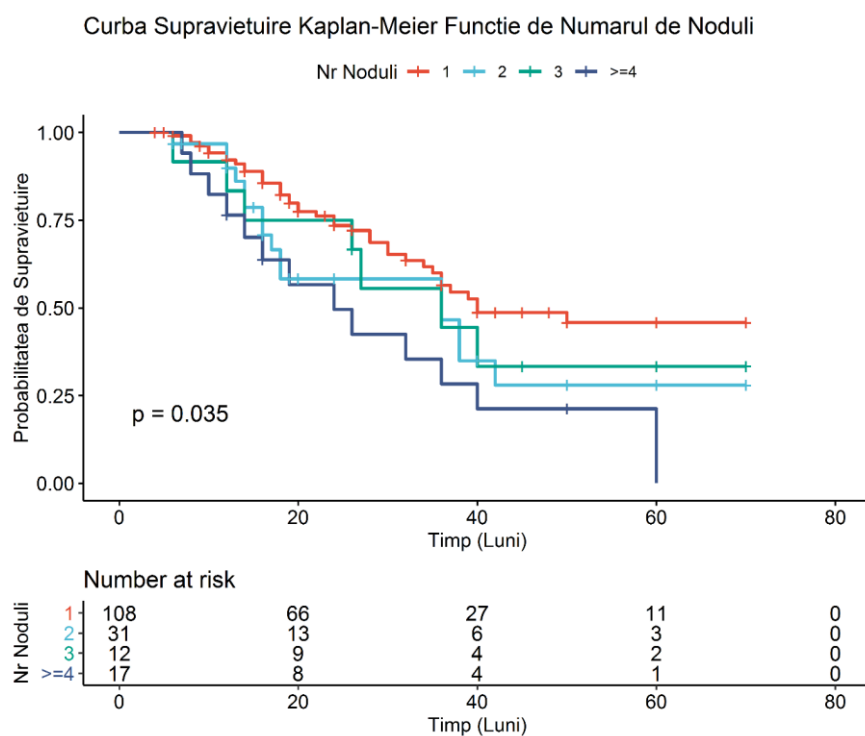


Fig.2. Supraviețuirea în funcție de numărul de noduli

Rata de supraviețuire a pacienților cu răspuns complet după TACE a fost mai mare decât cea a pacienților fără răspuns complet ($p < 0,001$). Pacienții care au obținut răspuns complet comparativ cu pacienții fără răspuns complet au prezentat o rată cumulativă de supraviețuire de 97,6% vs. 83% după 1 an și 77,14% vs. 52,94% la 2 ani). (Fig.3)

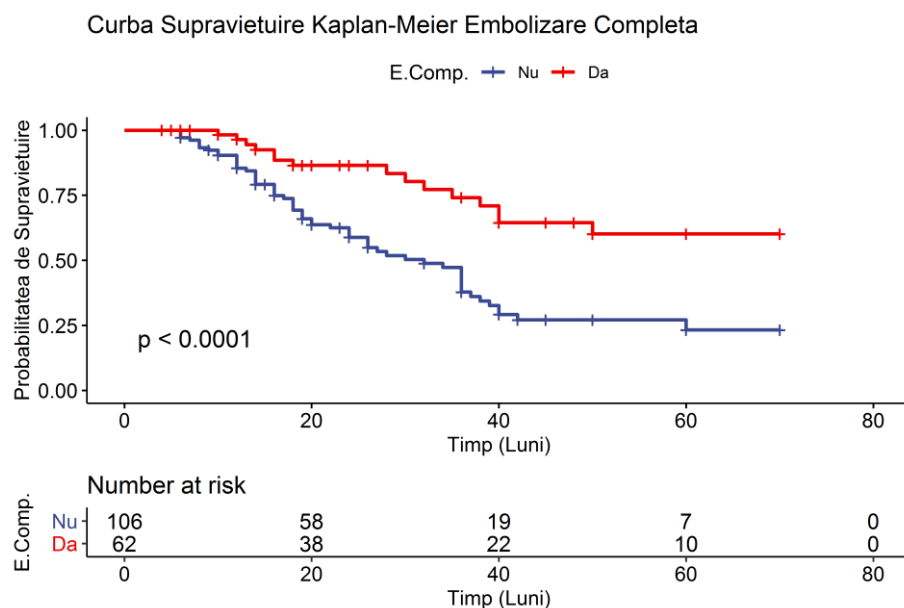


Fig.3. Supraviețuire în funcție de răspunsul terapeutic

Rata de supraviețuire a pacienților cu CHC cu o concentrație serică normală a AFP (≤ 22 ng/mL) a fost mai mare decât cea a pacienților cu nivel crescut al AFP seric (> 22 ng/mL). Rata de supraviețuire a pacienților cu AFP seric crescut a fost la 1 și respectiv 2 ani, mai mică decât la pacienții cu concentrație serică normală a AFP (86,7 % față de 92,4%, respectiv 58.97% față de 65.96%) (Fig. 4).

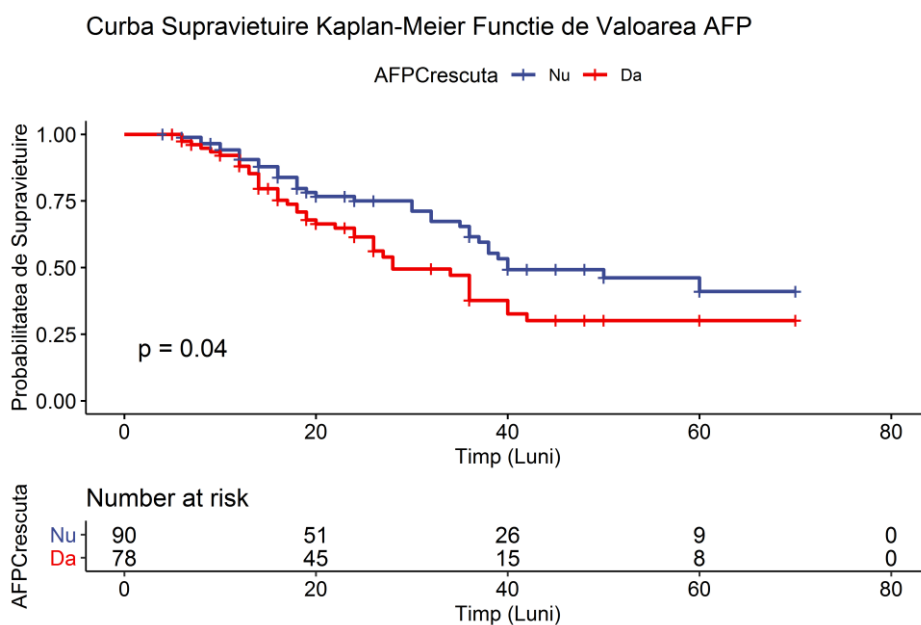


Fig. 4. Supraviețuirea în funcție de valoarea AFP

Pacienții cu noduli tumorali în cadrul criteriilor Milano au avut o rată de supraviețuire semnificativ mai mare decât cea a pacienților cu CHC în afara criteriilor Milano. Rata de supraviețuire a pacienților în afara criteriilor Milano a fost la 1 și 2 ani mai mică decât la pacienții care au îndeplinit criteriile Milano (80,1% față de 93,5%, respectiv 71.88%, față de 86.36%).

Pacienții cu CHC fără tromboză a venei porte au avut o rată mai mare de supraviețuire decât a pacienților ce au prezentat tromboza venei porte. Rata de supraviețuire cumulativă la 1 și 2 ani a fost mai mică la pacienții cu tromboza venei porte decât la pacienții fără tromboză (61,5% față de 93%, respectiv 60.00% față de 77.78%).

Analiza univariată a evidențiat faptul că nivelul crescut al AFP seric (> 20 ng/ml), absența criteriilor Milano, multinodularitatea, lipsa obținerii unui RC post TACE, prezența trombozei venei porte și recurența după RC au fost corelați cu o supraviețuire redusă după TACE.

Analiza multivariată a evidențiat ca factori predictivi independenți ce influențează negativ supraviețuirea: nivelul AFP seric crescut (> 22 ng/ml), prezența unor tumori în afara criteriilor Milano, lipsa unui RC post TACE și prezența trombozei venei porte.

În continuare am efectuat o analiză de tip regresie Cox semiparametrică, în acest caz putând fi analizate și variabilele continue (e. G vârstă). Cel mai mare impact l-au avut embolizarea completă și transplantul hepatic (ambele scad riscul de deces de aproximativ 3 ori), în timp ce absența criteriilor Milano crește riscul de deces de aproape 3 ori. Dintre biomarkeri cu semnificație statistică au fost AFP, CĂ 19-9 (valorile crescute ale acestora cresc riscul de deces) și albumina (valorile scăzute ale acesteia cresc riscul de deces).

Prezența unui singur nodul de CHC este o indicație pentru tratamentul curativ, ca terapie de primă linie în conformitate cu recomandările [29]. Din pacienții incluși în studiu, 60,4% au avut un singur nodul, dar, în ciuda diagnosticului precoce, nu a fost fezabilă nici o metodă curativă ca terapie de primă linie. Principalele motive pentru acest fapt au fost reprezentate de localizarea tumorii și trombocitopenia pentru tratamentul prin ablație și gradul de hipertensiune portală combinată cu imposibilitatea unei abordări minim invazive pentru rezecția chirurgicală.

În studiul actual am demonstrat că prezența unui singur nodul tumoral și dimensiunea tumorii ($\leq 4,5$ cm) au fost factori predictivi pentru obținerea unui RC post TACE. O explicație a acestei descoperiri este că, în cazul unui singur nodul, ocluzia printr-o procedură de TACE a arterei care alimentează tumora este mai eficientă în comparație cu posibilitatea redusă de

embolizare completă a traectelor complexe de vascularizație a formațiunilor tumorale întâlnite la pacienții cu CHC multicentric.

Corelația dintre dimensiunea tumorii și RC a fost demonstrată anterior în mai multe lucrări [78, 79]. Golfieri și colab. au raportat că nodulii CHC ≤ 5 cm au fost cei care au răspuns cel mai bine la TACE cu o rată obținere a RC de 87,7% comparativ cu doar 25% la pacienții cu noduli cu diametrul > 5 cm [83]. În același studiu nu a existat o diferență semnificativă între rata obținerii RC la pacienții cu noduli mici (≤ 2) cm comparativ cu pacienții cu noduli între 2,1 și 5 cm (68% vs 64%) [83]. În grupul nostru, au obținut RC 69,2% dintre pacienții cu un singur nodul < 2 cm și 50,6% dintre cei cu noduli între 2,1 cm și 5 cm ($p = 0,66$).

Recurența tumorală după RC, ce poate ajunge până la 60% la un an post procedura, [80] este o problemă semnificativă cu care clinicienii se confruntă în cazul pacienților tratați prin TACE, această procedură având rata de recurență cea mai ridicată dintre toate celelalte metode de tratament local al CHC. Prin urmare, diagnosticul precoce al recurenței și selecția terapiei adecvate sunt factori extrem de importanți ce cresc rata de supraviețuire a pacienților.

Factorii de risc asociați recurenței au fost descriși în mai multe studii anterioare. Localizarea CHC, mărimea și numărul tumorilor, valoarea serică a markerilor tumorali, prezenta infecțiilor virale cronice, vârsta și funcția hepatică s-au dovedit a fi factori de risc pentru recurență după tratamentul cu TACE [81, 82, 83].

În studiul nostru, prezenta nodulilor multipli și concentrația serică crescută a AFP (> 25 ng/ml) au fost factori predictivi pentru recurența post RC. Tumorile multiple au fost asociate în mod semnificativ atât cu o rată scăzută de obținere a RC, cât și cu un risc ridicat de recurență la pacienții care au obținut RC. În plus, în concordanță cu studiul prezent, o lucrare anterioară a arătat că recurența s-a dezvoltat mai frecvent la pacienții cu CHC multinodular și niveluri serice crescute de AFP (> 20 ng/ml) comparativ cu cei cu nodul unic și valori scăzute ale AFP [84].

La pacienții cu noduli multipli de CHC, rata mai mare a recurenței tumorale poate fi explicată prin faptul că TACE, ca tratament local, nu poate detecta leziunile satelite din afara zonei de necroză indusă de TACE, iar tumorile reziduale microscopice nu pot fi detectabile imagistic în perioada timpurie după procedură de TACE. În plus, un studiu publicat a indicat faptul că, celule tumorale viabile au fost decelate adiacent capsulei fibroase a tumorilor, chiar în prezența necrozei complete la evaluarea imagistică post TACE, în cazurile în care țesuturile respective care au fost îndepărtate chirurgical ulterior [85]. Aceste constatări arată

în mod clar limitele evaluării radiologice a răspunsului tumoral și faptul că recurența locală se poate dezvolta timpuriu, însă devine decelabilă doar în timp.

Conform lui Rou leziuni tumorale nedecelabile la evaluarea CT care însă au fost detectate folosind TACE au fost raportate în până la 45% din cazuri [86]. În acest context, ar trebui efectuată o supraveghere mai atentă la pacienții cu CHC multinodular, chiar dacă au obținut remisie radiologică după TACE.

Un nivel ridicat al AFP seric la pacienții cu CHC este considerat, în general, un marker pentru un grad scăzut de diferențiere al tumorii comparativ cu CHC asociat cu un nivel normal al AFP. Riaz a raportat modificarea valorilor AFP după terapia loco-regională ca metodă de evaluare a răspunsului tumoral datorită asocierii acestora cu recurența după RC, progresia și supraviețuirea [87]. În studiul nostru am constatat că un nivel inițial ridicat al AFP seric (> 25 ng/ml) a fost un factor predictiv pentru recurența, ceea ce sugerează că CHC asociat cu un nivel crescut al AFP seric trebuie urmărit mai îndeaproape și ar trebui luate în considerare tratamente suplimentare locoregionale, în cazul în care acest lucru este fezabil.

Ratele supraviețuirii generale ale întregii populații de pacienți, excluzând pacienții care au suferit transplant hepatic, considerați supraviețuitori pe termen lung, au fost la 88,7% și respectiv 40,1% la 1 și respectiv 3 ani. Aceste date demonstrează rate de supraviețuire similare celor observate într-o cohortă italiană ce raportează o supraviețuire la 1 și 3 ani de 85% și respectiv 50% la pacienții tratați cu TACE pentru un nodul unic de CHC [88]. În ciuda faptului că, în seria italiană, a existat un număr mare de pacienți încadrați în clasa Child Pugh B, toți având un singur nodul de CHC, spre deosebire de cohorta noastră care a inclus aproape numai pacienții în clasa Child-Pugh A, rata de supraviețuire a fost similară în ambele grupuri. Explicația acestei constatări ar putea fi faptul că în grupul nostru, 35,7% dintre pacienți au avut CHC multinodular ce a avut un impact negativ asupra supraviețuirii.

Deși mai multe lucrări din Asia au raportat multinodularitatea ca fiind cel mai puternic predictor pentru recurența și supraviețuirea după TACE [89, 90], acesta este primul studiu din Europa Centrală și de Est care evaluează supraviețuirea generală și determinanții clinici ai recurenței și supraviețuirii la pacienții tratați prin TACE.

Tromboza non-malignă a venei porte (TVP) la pacienții cu CHC reprezintă o provocare terapeutică și a fost considerată o contraindicație pentru TACE din cauza riscului de necroză sau de deteriorare severă a funcției hepatice [91]. Studiile recente au demonstrat că TACE s-a dovedit a fi o opțiune sigură de tratament pentru pacienții cu CHC și TVP ce aduce un beneficiu de supraviețuire comparativ cu tratamentul conservator atunci când această procedură este efectuată într-o manieră selectivă [92, 93].

În lotul nostru am inclus un număr limitat de pacienți cu TVP parțială non-malignă (n = 17) ce au efectuat TACE și în ciuda faptului că niciunul dintre acești pacienți nu a dezvoltat decompensare hepatică acută după procedură, iar prezența TVP nu a fost un factor predictiv pentru recurență, a existat un impact negativ semnificativ asupra supraviețuirii generale la acești pacienți. Această constatare este similară cu cea observată într-o serie mare de pacienți din Coreea de Sud (deși în acel studiu nu a fost raportat faptul că a fost vorba despre TVP cruorică sau malignă). S-a demonstrat anterior într-o serie mare că TVP s-a dovedit a fi asociată independent cu rata inferioară de supraviețuire la pacienții cu ciroză care sunt evaluați pentru transplant hepatic [94].

Cu toate că Docaens și alți autori au susținut faptul că tratamentul prin TACE anterior transplantului hepatic nu prelungește supraviețuirea pe termen lung [95] și rolul tratamentului prin TACE ca „bridging therapy” pentru pacienții CHC aflați pe lista de așteptare încă rămâne controversat [96,97], în cazul cohortei noastre am demonstrat că transplantul hepatic după TACE duce la creșterea supraviețuirii ($p = 0,0007$). Această constatare întărește faptul că pacienții tratați cu TACE trebuie trimiși pentru a fi evaluați în vederea transplantului hepatic chiar dacă au obținut RC, din cauza riscului de recurență post TACE pe termen lung și a scăderii supraviețuirii în lipsa transplantului.

La momentul apariției embolizării superselective cu DEBDOX, aceasta a fost considerată o metodă de tratament potențial curativ, cu rezultate mai bune comparativ cu procedura TACE paliativă [98,99]. În studiul nostru nu a existat o diferență semnificativă între pacienții tratați cu cTACE în comparație cu cei cu DEBDOX în ceea ce privește rata RC, rata de recurență sau SG.

Există cazuri în care este dificil de a se detecta țesutul viabil rezidual în masa tumorală rămasă, deoarece acumularea de lipiodol poate fi prezentă nespecific în jurul tumorii și astfel spălarea lipiodolului nu poate fi evaluată corect după prima evaluare imagistică prin CT efectuată la 4 săptămâni după TACE. Pentru a evita acest fapt am considerat că pacienții au RC doar la momentul celei de-a doua examinări imagistice (fie CT sau RMN) efectuat la 12 săptămâni după procedură inițială.

O limitare a studiului nostru este că toate datele au fost obținute dintr-un singur centru, deoarece unitatea noastră este singura din România unde se efectuează în mod obișnuit TACE. Deși tratamentul prin TACE este indicat la pacienții cu CHC în stadiul intermediar conform cu sistemul de stadializare BCLC, în studiul nostru am inclus și pacienți cu CHC în stadiu incipient la care nu s-a putut efectua rezecție, ablație prin radiofrecvență sau transplant

hepatic din cauza vârstei înaintate, localizării inaccesibile pentru rezecție chirurgicală sau ablație sau timpului îndelungat de așteptare pe lista de transplant hepatic.

Odată cu creșterea treptată a vârstei pacienților cu CHC, tot mai mulți dintre aceștia vor fi excluși de la terapie conform ghidurilor de tratament din cauza prezenței complicațiilor și a unui status de performanță scăzut printre alți factori. În viitor în practică clinică, medicii vor trebui să aleagă mai frecvent TACE în locul terapiilor ablative sau intervenției chirurgicale chiar și în cazurile de tumori unice cu diametru redus. Astfel, este nevoie să se definească mai bine populațiile de pacienți care au cele mai mari șanse de a obține RC dar și cei ce prezintă un risc crescut de recurență.

Conform concluziilor acestui studiu, pacienții ce prezintă inițial o valoare a AFP mică, și un nodul tumoral unic cu diametrul mai mic de 5 cm au cele mai bune șanse de a obține RC după terapia cu TACE. Multinodularitatea și nivelul AFP seric crescut au fost asociați semnificativ cu un risc crescut de recurență după obținerea RC. O valoare inițial crescută a AFP, dimensiunea tumorii peste 5 cm și prezența trombozei venei porte au fost corelate cu o supraviețuire globală scăzută. Factori de prognostic pozitiv au fost reprezentați de boala tumorală în cadrul criteriilor Milano și efectuarea transplantului hepatic.

Capitolul 11 prezintă cel de-al doilea studiu de tip prospectiv au fost înrolați de 59 de pacienți diagnosticați cu CHC (41 dintre aceștia au efectuat TACE ca modalitate inițială de tratament) având ca obiectiv de a investiga utilitatea clinica a determinării AFP și a protrombinei indusă de absența vitaminei K (PIVKA) în evaluarea răspunsului la tratament la o lună, la pacienții cu CHC, tratați prin TACE. Nivelurile inițiale ale AFP și PIVKA au fost determinate anterior primei proceduri de TACE.

A existat o diferență semnificativă între valorile PIVKA ($p = 0,0005$) între pacienții care îndeplinesc criteriile Milano și pacienții în afara criteriilor Milano, dar fără semnificație pentru AFP ($p = 0,67$). Valorile AFP (85,5 vs. 18,7 ng/ml, $p = 0,035$) și valorile PIVKA (693,2 față de 58,2 ng/ml, $p = 0,0003$) au fost semnificativ mai mici numai la pacienții care au obținut un răspuns complet după o procedură TACE nu și la pacienții cu răspunsul tumoral parțial. Pentru evaluarea completă a răspunsului, aria de sub curba (ASC) pentru PIVKA seric a fost 0,903, a fost semnificativ mai bună ($p = 0,05$) decât pentru AFP. Valoarea PIVKA a fost corelată moderat ($p = 0,001$, $r = 0,5$) cu diametrul inițial maxim al nodulului tumoral.

Evaluarea răspunsului tumoral utilizând CT sau RMN după tratamentul loco-regional este utilizat pe scară largă pentru a decide necesitatea continuării tratamentului prin aceeași abordare terapeutică, sau schimbarea strategiei de tratament. Metodele imagistice au un cost ridicat și un risc de neoplazie datorită expunerii repetate a pacientului la radiații ionizante, în

timp ce evaluarea markerilor tumoralilor după tratamentul tumoral este rapidă, mai ușor de efectuat și mai puțin costisitoare. Din aceste motive, implicațiile clinice ale evaluării răspunsului tumoral utilizând markeri tumoralilor au fost intens investigate în ultimii ani.

În acest context, nivelurile serice ale PIVKA au fost măsurate de peste 2 decade în unele țări, în special din Asia, însă acesta este primul studiu care evaluează nivelurile PIVKA la pacienții din România.

Atât valorile AFP cât și ale PIVKA ca biomarkeri pentru CHC au fost, de asemenea, raportate a fi factori predictivi ai potențialului malign al tumorii.

Mai multe studii [100,101] au arătat că nivelurile pretratament ale AFP > 400 ng/ml și PIVKA > 200mAU/ml au fost asociate cu dimensiunea mai mare a tumorilor, număr mai mare de noduli, stadiu avansat al bolii, invazia canalului biliar, invazia vasculară și o perioadă de supraviețuire redusă. Am reușit să demonstrăm într-o cohortă de pacienți din România că nivelurile PIVKA sunt puternic asociate atât cu diametrul tumorii cât și leziunile tumorale avansate, în afara criteriilor Milano. Corelația dintre PIVKA și extensia tumorală ar trebui luată în considerare atunci când se decide evaluarea pacienților pentru listarea în vederea transplantului hepatic din cauza riscului ridicat de recurență a CHC.

Aspectul radiologic post TACE poate fi în unele cazuri neomogen și dificil de evaluat din cauza captării neregulate a lipiodolului și a necrozei, ceea ce poate compromite evaluarea bazată pe imagistică a răspunsului tumoral. O lucrare anterioară a evaluat nivelurile serice ale AFP și PIVKA în efortul de a depăși această limitare și a raportat că reducerea post tratament atât al nivelului AFP cât și al PIVKA la pacienții care prezintă răspuns complet sunt semnificativ mai mari decât cei care nu au atins răspuns complet [106]. De asemenea, o asociere puternică între răspunsul radiologic și nivelurile serice ale AFP și PIVKA a fost raportată de către aceeași autori [102]. Pe de altă parte, într-un alt studiu, nivelul seric al AFP a fost semnificativ corelat cu răspunsul radiologic post TACE, dar nu s-a observat o corelație și cu nivelul seric al PIVKA [103].

Am demonstrat că atât valorile AFP cât și cele PIVKA au avut o scădere semnificativă la o lună la toți pacienții tratați prin TACE, astfel încât PIVKA poate fi considerat alături de AFP un biomarker foarte util la urmărirea pacienților după terapia TACE.

În studiul nostru ne-am concentrat asupra valorii predictive a răspunsurilor AFP și PIVKA și a combinației acestora pentru răspunsul complet la o lună după TACE, ceea ce este diferit de studiile anterioare ce s-au concentrat asupra valorii prognostice a AFP inițial și a PIVKA la toți pacienții cu CHC nou diagnosticat.

În grupul de pacienți studiat, cu toate că atât nivelurile AFP cât și PIVKA au scăzut la o lună post TACE la pacienții ce au obținut răspuns complet, doar valorile PIVKA ($ASC = 0,903$) și nu AFP ($ASC = 0,662$) la 1 lună au fost corelate semnificativ ($p = 0,05$) cu un răspuns complet și astfel PIVKA este un biomarker mai bun decât AFP pentru a prezice răspunsului la tratament și al prognosticului.

La o lună, o valoare cut-off pentru $PIVKA \leq 53,46 \text{ mAU/mL}$ a fost predictivă pentru răspunsul complet post TACE cu o sensibilitate de 73% care este mai mare decât sensibilitatea pentru AFP de numai 33,3%, ceea ce face ca PIVKA să fie un marker acceptabil pentru screening-ul răspunsului la TACE. Din acest punct de vedere, predicția rezultatului la tratament în perioada precoce post TACE inițială este extrem de importantă. Rezultatele prezente pot ajuta medicii să determine cu exactitate evoluția bolii și să stabilească planul de tratament suplimentar după o procedură inițială de TACE.

Conform rezultatelor acestui studiu, răspunsurile AFP și PIVKA la o lună par a fi predictorii semnificativi ai rezultatului tratamentului prin TACE și a răspunsului radiologic complet la pacienții cu CHC. A existat o scădere semnificativă a valorilor AFP și PIVKA la pacienții tratați prin TACE, care au obținut un răspuns complet, acest element poate fi utilizat pentru a prezice mai exact rezultatele obținute post TACE prin dezvoltarea unui model în care să fie încorporat atât răspunsul markerilor tumorali cât cel radiologic pentru a compensa limitările fiecăreia. PIVKA s-a dovedit a fi un marker mai eficient al predicției răspunsului tumoral decât AFP.

Capitolul 12 descrie a treia cercetare, un studiu prospectiv de tip caz control au fost înrolați un număr de 59 de pacienți cu CHC și 54 de pacienți control cu ciroză hepatică (CH). Acest studiu a avut scopul de a investiga utilitatea clinică a măsurării simultane a AFP și a PIVKA pentru diagnosticul CHC în special în cazul tumorilor incipiente, în comparație cu tradiționalul AFP ca marker unic pentru prima dată la pacienții din România.

Infecția VHC a fost cea mai comună etiologie în ambele grupuri, urmată de infecția cu VHB. Nu au existat diferențe semnificative în funcție de clasa Child-Pugh între cele două grupuri de pacienți.

Performanța AFP, PIVKA și a combinației lor pentru a diferenția pacienții cu CHC de cei cu CH a fost evaluată în cadrul tuturor pacienților incluși în studiu dar și pe două subgrupuri de pacienți cu CHC. A fost efectuată o comparație a ASC, sensibilității și specificității în a diferenția CHC față de CH într-un subgrup de pacienți cu CHC având un nivel al AFP $< 20 \text{ ng/mL}$ și într-un alt subgrup de pacienți cu CHC în stadiu incipient (BCLC 0 și A).

Evaluarea performanței la toți pacienții incluși în studiu a arătat că o combinație de AFP + PIVKA a avut cea mai bună ASC (0,862) pentru diagnosticul CHC, Comparativ cu ASC pentru AFP (cut-off: 6 ng/ml) de 0,831 și pentru PIVKA (cut-off 63 mAU/ml), (0,759). Ca biomarker unic PIVKA a arătat cea mai bună ASC (0.751), cu o sensibilitate de 81,4% și o specificitate de 62,5%, în sublotul de pacienți cu AFP < 20ng/dL.

AFP ca biomarker unic pentru diagnosticul precoce al CHC, a avut cea mai bună ASC 0,825, cu o sensibilitate de 69,7% și o specificitate de 75,7%, fiind cel mai specific marker unic. Deși PIVKA a avut o sensibilitate mai bună decât AFP pentru diagnosticarea precoce al CHC, specificitatea a fost mai mică (60,6%) decât pentru AFP. Combinația celor doi biomarkeri (AFP> 6ng/ml și PIVKA> 63 mAU/mL) a avut o ASC de 0,867, care a fost superioară fiecărui marker individual.

În completarea ultrasonografiei hepatice și a altor metode imagistice, clinicienii depind de biomarkeri serici, cum ar fi AFP, pentru diagnosticul CHC, în special în zonele în care tehnicile de diagnostic imagistic avansat nu sunt ușor disponibile.

Deși AFP este utilizat de medici pentru evaluarea CHC în completarea unui examen imagistic, acesta nu este un marker performant nefiind recomandat de ghidurile actuale din cauza sensibilității și a specificității reduse. Acest lucru face ca determinarea AFP să fie insuficientă pentru diagnosticul precoce al CHC, cu pierderea ulterioară a posibilității de tratare eficientă a acestor pacienți.

Hepatita cronică VHC este considerată că principala cauză a cirozei și a CHC în țările occidentale [104]. În studiul nostru, hepatita cronică VHC a fost cea mai frecventă cauză atât în grupul de pacienți cu CHC, cât și în cazul grupului de control cu CH. Prin urmare, rezultatele studiului nostru ar putea fi reprezentative pentru populația din România. În conformitate alte studii publicate anterior în cadrul studiului nostru nu a fost demonstrată nici o corelație între PIVKA și AFP ceea ce a permis să evaluăm performanța diagnostică a combinației celor doi biomarkeri.

Concentrația serică a PIVKA a crescut în paralel cu creșterea stadiului BCLC în timp ce valorile AFP nu au avut nici o corelație cu stadiul tumoral. Această constatare ar putea fi explicată prin faptul că într-un studiu anterior am demonstrat o corelație semnificativă a diametrului tumoral cu valorile serice ale PIVKA [105].

Valorile de cut-off pentru fiecare biomarker au fost fixate pe baza valorii care a condus la cea mai mare ASC. Cu toate că analiză pe fiecare subgrup a dus la cut-off uri ușor diferite pentru evita confuzia generată de schimbarea cut-off urilor pentru scenariile clinice diferite am

luat decizia de a folosi același cut-off pentru fiecare biomarker pentru a ușura folosirea în practică de zi cu zi.

Pentru diagnosticul CHC, valoarea optimă a cut-off-ului pentru PIVKA, ce a rezultat după analiza curbei ROC, a fost de 63 mAU/mL. Conform studiilor anterioare valoarea optimă pentru PIVKA ca biomarker de diagnostic pentru CHC, a fost estimată în intervalul 30-42 mAU/ml, iar variabilitatea acesteia se poate datora bolii hepatice preexistente. Valoarea de cut-off a PIVKA în cadrul studiului actual, pentru diagnosticul CHC este mai mare decât valorile raportate anterior. O explicație pentru acesta constatare ar putea fi faptul că nivelele serice ale PIVKA la pacienții cu CHC cresc odată cu progresia bolii hepatice de fond, iar includerea pacienților cu boala hepatică mai avansată, spre deosebire de alte studii anterioare ar putea explica valoarea diferită obținută în studiul nostru a cut-off-ului optim pentru diagnosticul CHC.

Am reușit să demonstrăm că PIVKA (cut-off: 63mAU/ml) a avut o sensibilitate mai bună, dar o specificitate mai scăzută decât AFP în toate grupurile studiate. Combinația dintre AFP și PIVKA la cut-off urile mai sus menționate a crescut specificitatea și valoarea predictivă pozitivă în detrimentul sensibilității.

În subgrupul pacienților cu AFP <20 ng/ml, PIVKA a prezentat cea mai ridicată sensibilitate (80,6%) și cea mai bună ASC (0,751, CI 95%), ca marker unic. Acuratețea diagnostica a PIVKA a fost ușor superioară față de cea a AFP în acest subgrup de pacienți, însă fără semnificație statistică.

Studiile anterioare au arătat că PIVKA ar putea fi util pentru diagnosticul precoce al CHC de mici dimensiuni. Combinația de AFP > 6ng/ml și PIVKA > 63mAU/ml au avut cea mai mare ASC la subgrupul de pacienți cu CHC incipient (0,867, 95% CI), cu o sensibilitate de 72,7% și o specificitate de 90,9%. Pentru diagnosticul CHC precoce, PIVKA a avut o sensibilitate de 76,7% comparativ cu 69% pentru AFP, dar specificitatea a fost mai mică, 60,6% respectiv 75,7% pentru AFP. Aceste constatări sunt în concordanță cu cele ale unor studii anterioare ce au demonstrat că pentru acest grup de pacienți PIVKA a avut o sensibilitate mai bună, dar o specificitate inferioară față de AFP. Rezultatele obținute de noi sunt ușor diferite de cele raportate într-un studiu francez [106], în care autorii au demonstrat că, pentru pacienții cu CHC precoce, PIVKA a avut o performanță mai bună pentru diagnostic decât AFP, cu o sensibilitate de 77% (față de 75,7%) și specificitate de 82% (față de 61%), la un cut-off de 42mAU/ml pentru PIVKA și de 5,5 ng/ml pentru AFP.

Determinarea PIVKA este convenabilă, are un cost redus și ar putea reprezenta o adiție importantă la opțiunile actuale de diagnostic, însă trebuie luat în considerare faptul că există

diferiți factori ce ar putea influența performanța diagnostică a acestui biomarker. Întrucât atât nivelurile de AFP cât și de PIVKA sunt mai crescute la pacienții cu CHC decât la pacienții fără CHC și la indivizii sănătoși, pot fi încercate diferite cut-off-uri pentru a îmbunătăți suplimentar specificitatea.

Conform rezultatelor acestui studiu, PIVKA ca marker unic nu s-a dovedit a fi superior AFP pentru diagnosticul CHC. Combinația dintre AFP și PIVKA poate fi extrem de utilă împreună cu metodele curente de examinare imagistică pentru diagnosticul CHC, datorită performanțelor ridicate în diagnosticul CHC, în special la pacienții cu valori scăzute ale AFP și la pacienții cu tumori în stadiu incipient.

Capitolul 13 descrie cea de-a patra cercetare efectuată în cadrul prezentei teze de doctorat, un studiu prospectiv de tip caz control ce a urmărit să investigheze performanțele diagnostice ale AFP, AFP-L3 PIVKA și glicican (GPC3) ca markeri individuali sau în combinație pentru diagnosticul CHC pentru prima dată la pacienții din România. Lotul descris anterior a fost extins la 116 pacienți nou diagnosticați cu CHC și 66 de pacienți cu CH.

S-a observat faptul că fiecare biomarker studiat a avut o distribuție diferită a nivelului seric și a intervalului de valori. Coeficientul de corelație pentru AFP și PIVKA a fost 0.107, în timp ce pentru AFP și GPC3 a fost 0.102. A existat o bună corelație între AFP și AFP-L3, cu un coeficient de 0.51.

Pentru AFP valoarea ASC a fost de 0.83, iar valoarea de cut-off pentru AFP, care să maximizeze performanța, a fost calculată folosind algoritmul Youden, și este de 6.07 ng/mL care este asociată cu o sensibilitate de 78% și o specificitate de 76%. Pentru PIVKA valoarea ASC a fost de 0.756, conform algoritmului Youden, cea mai bună performanță este obținută pentru o valoare cut-off de 74.64 mAU/mL, cu o sensibilitate de 81% și o specificitate de 61%. Valoarea ASC pentru AFP-L3 este de 0.66, o valoare mult sub cea optimă de 0.90. Performanța optimă, conform metodei Youden este obținută pentru o sensibilitate de 93% și o specificitate de 44%, la o valoare de cut-off de 13.55 ng/mL. Valoarea ASC pentru GPC3 de 0.523, este apropiată de 0.50, biomarkerul neavând o valoare mare pentru diagnosticul de CHC. Performanța maximă, calculată cu ajutorul metodei Youden, este obținută pentru o valoare de cut-off de 466.00 ng/dL, cu o specificitate de 84% și o sensibilitate de 16%.

Observăm că doar pentru 2 biomarkeri regresia logistică univariată a decelat interacțiuni cu semnificație statistică (AFP și PIVKA), regresia logistică multivariată fiind folosită cu acești 2 termeni. În urma efectuării regresiei logistice multivariate pentru combinația dintre AFP și PIVKA am obținut o ASC de 0.887 aproape de valoarea optimă (0.90), cei 2 biomarkeri având o valoare diagnostică. Performanța optimă este la o sensibilitate de 82% și

o specificitate de 81%. Ratele de eroare ale modelului regresiei logistice multivariate au fost 14.05% nestandardizată, și de 14.06% standardizată.

Curba ROC pentru diagnosticul CHC utilizând AFP total, AFP-L3, PIVKA și GPC3 sunt prezentate în Fig. 5.

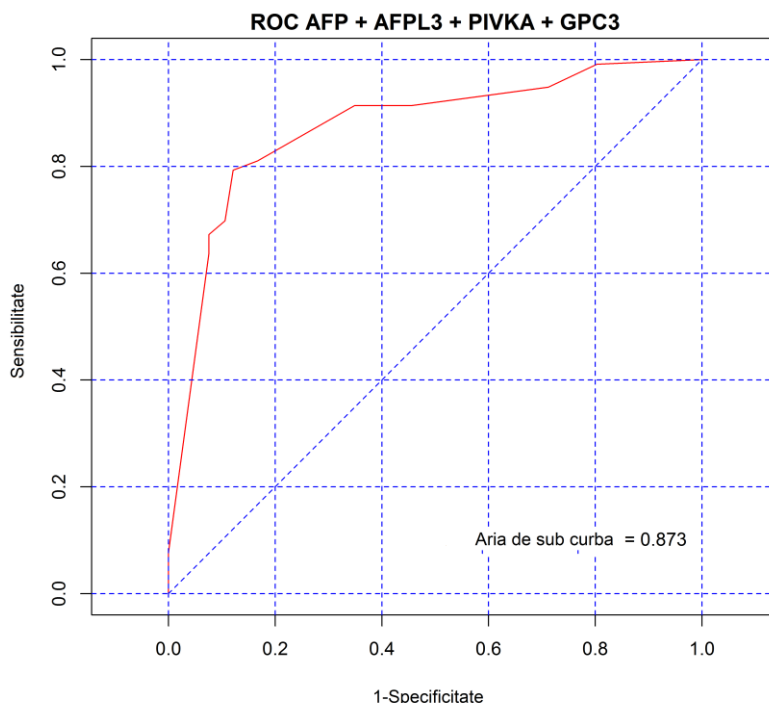


Fig. 5. Curba ROC pentru diagnosticul CHC folosind AFP, AFP-L3, PIVKA si GPC3

Tabel 1. Valoarea diagnostică a AFP, AFP-L3, PIVKA, GPC3 și a combinațiilor acestora pentru diagnosticul CHC

Model	SN	SP	PLR	NLR	PPV	NPV	ASC
AFP	0.78	0.76	3.23	0.28	0.85	0.67	0.77
AFPL3	0.93	0.44	1.66	0.16	0.74	0.78	0.68
PIVKA	0.81	0.60	2.05	0.31	0.78	0.64	0.71
GPC3	0.15	0.84	2.56	0.90	0.82	0.39	0.55
AFP + AFPL3	0.77	0.91	8.44	0.26	0.94	0.69	0.82
AFP + PIVKA	0.78	0.76	3.24	0.28	0.85	0.67	0.83
AFP + GPC3	0.78	0.76	3.24	0.28	0.85	0.67	0.79
AFPL3 + PIVKA	0.75	0.74	2.91	0.34	0.84	0.63	0.78
AFPL3 + GPC3	0.93	0.44	1.66	0.16	0.74	0.78	0.70
PIVKA + GPC3	0.86	0.58	2.03	0.24	0.78	0.70	0.73
AFP + AFPL3 + PIVKA	0.77	0.91	8.44	0.26	0.94	0.69	0.87

AFP + AFPL3 + GPC3	0.77	0.91	8.44	0.26	0.94	0.69	0.86
AFP + PIVKA + GPC3	0.69	0.88	5.69	0.35	0.91	0.62	0.84
AFPL3 + PIVKA + GPC3	0.80	0.71	2.78	0.28	0.83	0.67	0.79
AFP + AFPL3 + PIVKA + GPC3	0.79	0.88	6.54	0.23	0.92	0.70	0.87

În urma evaluării utilității diagnostice într-un sublot de pacienți cu CHC incipient (nodul unic cu diametrul sub 20mm), am observat că AFP ca marker unic prezintă o sensibilitate de 64% și o specificitate de 76% având cea mai bună ASC (0.70) dintre toți biomarkerii studiați. Combinația cu cea mai utilă, în același sublot, folosind doi biomarkeri a fost demonstrată a fi AFP asociat cu AFP-L3 (specificitate 64%, sensibilitate 91%).

Ca markeri de diagnostic pentru CHC, în cadrul sublotului de pacienți cu AFP normal (<6.07ng/mL) PIVKA a avut cea mai mare ASC (0.68) cu o sensibilitate de 72% și o specificitate de 64%. La același sublot de pacienți asocierea PIVKA cu AFP-L3 sau GPC3 nu a crescut suplimentar acuratețea diagnostică.

În ceea ce privește combinațiile triple de biomarkeri, combinația AFP >6.07ng/mL, AFP-L3 > 13.55ng/mL și PIVKA 74 mAU/ml au avut cea mai bună sensibilitate (77%) cu o specificitate de 91%, similară asocierii dintre AFP-L3 și PIVKA. Combinația dintre toți cei patru biomarkeri (AFP, AFP-L3, PIVKA și GPC3) a dus la o creștere nesemnificativă a sensibilității (79%) comparativ cu panelul de trei biomarkeri fără a îmbunătăți suplimentar acuratețea diagnostică.

S-a demonstrat în studiile anterioare că PIVKA este fi util în diagnosticul precoce a leziunilor de CHC de mici dimensiuni [107]. În plus, mai multe lucrări publicate cele mai multe din Asia au arătat faptul că asocierea AFP-L3 cu PIVKA ar putea îmbunătăți rata de detecție a CHC [108,109]. Lim și colab. au arătat că determinarea simultană a AFP, AFP-L3 și PIVKA îmbunătățește performanța de diagnostic a CHC în rândul pacienților cu CH în comparație cu fiecare biomarker utilizat individual [110].

PIVKA este un precursor al protrombinei, iar sinteza sa este indusă de deficitul de vitamină K. Celulele tumorale hepatice au niveluri mai scăzute de vitamina K decât celulele normale și acest fapt explică nivelurile extrem de scăzute ale PIVKA la persoanele sănătoase. Pe de altă parte, nivelul PIVKA este crescut nu doar la pacienții cu CHC, cât și la pacienții cu hepatită cronică sau ciroză hepatică, ceea ce îi limitează acuratețea diagnostică [111]. În studiul nostru am constatat că, PIVKA, ca marker unic, a avut o sensibilitate de 81,3% comparativ cu 52,5% pentru AFP pentru diagnosticul de CHC. Mai multe studii au demonstrat că PIVKA este detectat la pacienții cu CHC seronegativi pentru AFP și oferă o

sensibilitate mai bună decât AFP pentru diagnosticul CHC, ceea ce este în concordanță cu rezultatele noastre [112].

Bazându-se pe faptul că valoarea GPC3 a fost inițial raportată ca fiind crescută la aproximativ 50% dintre pacienții cu CHC, dar nedetectabilă în subiecții fără boală hepatică, cercetătorii au fost investigați GPC3 ca un nou biomarker de diagnostic pentru CHC.

Deși inițial s-a considerat că GPC3 ar putea fi înlocui, fie ar fi utilizat în asociere cu AFP, studiile ulterioare au dat rezultate contradictorii asupra acurateții măsurării acestui biomarker [113]. În studiul nostru, atât sensibilitatea cât și specificitatea și ASC ale GPC3 au fost comparabile cu rezultatele anterior publicate însă valoarea de cut-off (466pg/mL) determinată de noi prin analiza ROC a fost diferită față de alte valori raportate în literatură, care variază extrem de larg de la 3,9 pg/ml până la 300 ng/ml. În analiza noastră, GPC3 a avut cea mai scăzută ASC comparativ cu toți biomarkerii studiați (0,5233), iar ca marker unic, nu s-a dovedit a fi util pentru diagnosticul CHC în comparație cu AFP.

Un biomarker de diagnostic pentru CHC ar trebui să fie sensibil, să diferențieze CHC de alte boli hepatice și ar trebui să fie detectabil în plasmă la niveluri ridicate chiar și în stadiile incipiente ale tumorii. În studiul nostru, determinarea valorilor serice ale AFP, AFP-L3, PIVKA și GPC3 nu dus la atingerea aceste standarde ca markeri unici, însă combinația lor a îmbunătățit semnificativ rata de detectare a CHC.

Liimitările studiului sunt reprezentate de faptul că toate eșantioanele au fost colectate la un singur centru și de faptul că s-a folosit doar un test ELISA pentru fiecare dintre biomarkerii studiați. Pacienții diagnosticați cu CHC, înrolați în studiu au fost heterogeni din punct de vedere al etiologiei bolii hepatice, stadiului tumorii și al funcției hepatice subiacente, care reflectă practica din lumea reală, dar acest fapt poate duce la variabilitate.

Conform rezultatelor acestui studiu AFP rămâne cel mai util marker individual pentru diagnosticul CHC, iar combinația dintre AFP, AFP-L3 și PIVKA ar putea maximiza performanța de diagnostic. Eforturile de a căuta combinații noi de biomarkeri pentru diagnosticul CHC ar trebui continuate.

Capitolul 14 trece în revistă concluziile și contribuțiile personale. Prin coroborarea datelor rezultate în urma analizelor efectuate asupra loturilor de pacienți diagnosticați cu carcinom hepatocelular ce au fost studiați în cadrul prezentei lucrări se formulează următoarele concluzii:

1. În cazul lotului de 168 de pacienți diagnosticați cu carcinom hepatocelular ce au efectuat chemoembolizare ca modalitate inițială de tratament în cadrul Institutul Clinic Fundeni,

vârsta medie la diagnostic a fost de 62.2 ± 7.9 ani, cu un minim de 36 de ani, un maxim de 82 de ani și o mediană de 63 de ani. Sexul masculin a predominat cu 115 pacienți (68.4%)

2. Cea mai frecventă etiologie a fost reprezentată de ciroza hepatică secundar infecție VHC în cazul a 98 de pacienți (58.3%), urmată de infecția VHB cu 29,7% din cazuri. Un număr de 108 pacienți (64.2%) au prezentat un nodul tumoral unic. Mediana diametrului maxim al nodulilor tumorali a fost de 35 mm (interval, de la 10 la 102 mm). Un număr de 17 pacienți (10,1%) au prezentat tromboza non-malignă a venei porte.

3. Proceduri de chemoembolizare clasică au fost efectuate în cazul a 124 de pacienți (73.8%), cu o medie de 2.1 proceduri/pacient și un maxim de 6 proceduri/pacient.

4. Din totalul de pacienți tratați prin chemoembolizare, 63 pacienți (37.5%) au obținut răspuns complet. Numărul total de noduli tratați a fost de 279. Recurența după obținerea răspunsului complet a fost detectată la 37 de pacienți pe o perioadă mediană de urmărire de 27 luni (interval de la 6 până la 65 de luni).

5 În analiza univariată, s-a observat că o valoare crescută a concentrației serice a AFP (> 22 ng/ml), absența criteriilor Milano, prezența nodulilor multipli, prezența unui nodul peste 5cm în diametru se asociază cu absența obținerii unui răspuns complet. Predictorii independenți (analiza multivariată) au fost dimensiunea tumorii (> 5 cm), multinodularitatea și o valoare crescută a AFP. Pentru un sublot de 71 de pacienți a fost analizat impactul asupra supraviețuirii și a răspunsului la chemoembolizare, a valorii inițiale a biomarkerilor AFP-L3, PIVKA și GPC3. Se observa că o valoare inițială crescută a PIVKA este un predictor independent al lipsei obținerii unui răspuns complet post chemoembolizare. Rata de concordanță a fost de 0.74 iar valoarea R^2 a fost de 0.095

6. Recurența CHC a fost diagnosticată la 37 pacienți (58,3%) dintre cei 63 de pacienți ce au obținut răspuns complet. După obținerea răspunsului complet, perioada mediană de urmărire până la apariția recurenței a fost de 12 luni (interval, 5 până la 24 de luni). Au existat 32 de recidive locale (86,4%) și 5 leziuni tumorale la distanță (13,5%).

În analiza univariată, multinodularitatea și nivelul crescut al AFP seric (> 25 ng/ml) au fost asociate cu recurența CHC după răspunsul complet indus de TACE. În analiza multivariată, AFP seric a crescut (> 25 ng/ml) și multinodularitatea au fost semnificativ asociate cu recurența tumorii după obținerea unui răspuns complet inițial.

7. Un număr de 75 de pacienți (44.64%) au decedat în timpul perioadei de urmărire (ianuarie 2014-decembrie 2018). Perioada medie de urmărire a fost de 27,4 luni (între 6-65 de luni) Rata globală de supraviețuire cumulativă la 1 și 2 ani a populației de studiu a fost de 88,5%, 62,8%. Nu au existat diferențe semnificative de supraviețuire între diversele etiologii ale

cirozei hepatice. A fost observat o diferență semnificativă între supraviețuirea pacienților ce au prezentat un nodul unic la momentul diagnosticului comparativ cu cei cu noduli multipli. Astfel supraviețuirea generală la 24 de luni a fost de 70.18% pentru cei cu nodul unui și doar de 25.00% la cei cu hepatocarcinom multicentric

8. Analiza univariată a evidențiat faptul că nivelul crescut al AFP seric (> 20 ng/ml), absenta criteriile Milano, multinodularitatea, lipsa obținerii unui răspuns complet, prezenta trombozei venei porte și recurența după răspuns complet au fost corelați cu o supraviețuire redusă după TACE. Analiza multivariată a evidențiat ca factori predictivi independenți ce influențează negativ supraviețuirea: nivelul AFP seric crescut (> 22 ng/ml), prezența unor tumori în afara criteriilor Milano, lipsa unui răspuns complet post TACE și prezenta trombozei venei porte.

9. În cazul sublotului de 41 de pacienți diagnosticați cu carcinom hepatocelular ce au efectuat TACE ca modalitate inițială de tratament la care am studiat utilitatea PIVKA pentru evaluarea răspunsului post TACE, mediile ale valorilor inițiale ale AFP și PIVKA au fost 240,3 (1,07-2000 ng/dl) și respectiv 1376,8 (23,8-12860 mAU/mL).

10. Aria de sub curba ROC (ASC) a AFP seric și a PIVKA seric, în conformitate cu criteriile Milano, a fost de 0,575 și 0,845, pentru cut-off-urile de 120,66 ng/ml și, respectiv, 1110,2 mAU/ml. Sensibilitatea și specificitatea pentru AFP și PIVKA la aceste scor cut-off-uri au fost 50,0% și 86,21%, 66,67% și respectiv 96,5%. A existat o diferență semnificativă între valorile PIVKA ($p = 0,0005$) între pacienții care îndeplinesc criteriile Milano și pacienții în afara criteriilor Milano, dar fără semnificație pentru AFP ($p = 0,67$).

11. Nu am găsit diferențe semnificative între valorile inițiale ale AFP și PIVKA între grupurile de pacienți cu VHB și VHC ($p = 0,28$ pentru AFP și $p = 0,17$ pentru PIVKA). A fost observată o scădere semnificativă a valorii AFP după o lună la pacienții cu cTACE (279,3 vs. 152,9 ng/ml, $p = 0,046$), dar nu la pacienții la care s-a efectuat DEBDOX (83,9 față de 14,5 ng/ml, $p = 0,296$). Valoarea PIVKA a scăzut semnificativ la o lună la pacienții cu cTACE (1698,4 față de 950 mAU/ml, $p = 0,015$), dar a atins doar o semnificație marginală la pacienții cu CHC care au fost efectuat DEBDOX TACE (197,6 vs. 105,4 mAU/ml, $p = 0,062$). Valorile AFP (85,5 vs. 18,7 ng/ml, $p = 0,035$) și valorile PIVKA (693,2 față de 58,2 ng/ml, $p = 0,0003$) au fost semnificativ mai mici numai la pacienții care au obținut un răspuns complet după o procedură TACE nu și la pacienții cu răspunsul tumoral parțial.

12. Pentru evaluarea completă a răspunsului, ASC pentru PIVKA seric a fost 0,903, a fost semnificativ mai bună ($p = 0,05$) decât pentru AFP 0,662. Valorile cut-off calculate au fost pentru AFP $\leq 5,05$ ng/mL (sensibilitate = 33,3%, specificitate = 100%) și pentru PIVKA $\leq$

53,46mAU/mL (sensibilitate = 73,3%, specificitate = 100%). Asocierea AFP cu PIVKA nu a îmbunătățit în continuare capacitatea de a diferenția răspunsul complet de cel parțial.

13. Valoarea PIVKA a fost corelată moderat ($p = 0,001$, $r = 0,5$) cu diametrul inițial maxim al nodulului tumoral, dar nu a existat o corelație între valoarea AFP și diametrul tumorii. La evaluarea relației dintre diametrul maxim al tumorii și valoarea PIVKA după TACE, am găsit aceeași corelație moderată ($p = 0,002$, $r = 0,55$). Nu a existat nici o corelație între valoarea AFP și diametrul maxim al tumorii după TACE.

14. La pacienții tratați cu terapie TACE, s-a observat o reducere a diametrului maxim al nodulului tumoral (30 vs 27 mm, $p = 0,02$).

15. În cadrul studiului de tip caz control în care au fost înrolați un număr de 59 de pacienți cu CHC nou diagnosticați și 54 de pacienți control cu ciroză hepatică, am observat o proporție mai mare de bărbați ($p = 0,04$) și o vârstă mai înaintată ($p = 0,03$) în grup cu CHC decât în cel control cu CH. Infecția VHC a fost cea mai comună etiologie în ambele grupuri, urmată de infecția cu VHB. Nu au existat diferențe semnificative în funcție de clasa Child-Pugh între cele două grupuri de pacienți.

16. Nivelurile mediane AFP seric și PIVKA s-au dovedit a fi semnificativ mai mari la pacienții cu CHC decât în grupul cu CH (AFP, 18 (IQR 6.63-104,56) vs. 4,75 (IQR (3,21-6,70) ng/ml; PIVKA 188,4 (IQR 81,36-723,21) vs 63 (IQR 34.73-160.03) mUA/mL. Nu a existat nici o corelație între nivelele serice ale AFP și PIVKA ($r = 0,107$).

17. Stadializarea CHC a fost efectuată folosind sistemul BCLC astfel: BCLC 0 la 16,9%, BCLC A la 38,9%, BCLC B la 20,3%, BCLC C la 18,6% și BCLC D la 5,1% din pacienții studiați. Analiza subgrupurilor de cazuri a arătat faptul ca pacienții în stadiul BCLC B, C și D comparați cu cei încadrați în clasele 0, A au avut un nivel semnificativ mai mare al nivelurilor serice de PIVKA (779,6 față de 160,5 mU/ml, $p = 0,01$). Pentru AFP nu există diferențe semnificative statistic între pacienții cu BCLC B, C și D vs. 0, A și B ($p = 0,78$).

18. Evaluarea performanței diagnostice la toți pacienții incluși în studiu a arătat că o combinație de AFP + PIVKA a avut cea mai bună ASC (0,862, 95% CI 0,774-0,926) pentru diagnosticul CHC, Comparativ cu ASC pentru AFP (cut-off: 6 ng/ml) de 0,831 (95% CI 0,734-0,899) și pentru PIVKA (cut-off 63 mAU/ml), 0,759 (95% CI 0,658-0,842). La valoarea de cut-off de 63mAU/ml PIVKA, s-a dovedit a fi mai sensibil (81,4%), dar mai puțin specific decât AFP.

19. În cohorta noastră, 36 de pacienți (61%) cu CHC și 46 de pacienți (85,2%) cu CH au avut o valoare a AFP <20 ng/ml. La acești pacienți ca biomarker unic PIVKA > 63 mAU/ml a arătat cea mai bună ASC (0.751, 95% CI 0,621-0,840), cu o sensibilitate de 81,4% și o

specificitate de 62,5%. Combinația celor doi biomarkeri (AFP > 6ng/ml și PIVKA > 63 mAU/mL) pentru diagnosticul CHC a avut o ASC de 0,862 ceea ce este semnificativ superior statistic decât pentru AFP ($p = 0,03$).

20. Un număr de 33 de pacienți (55,9%) au fost diagnosticați cu CHC într-un stadiu incipient al bolii (BCLC 0 sau A). AFP ca biomarker unic pentru diagnosticul precoce al CHC, a avut cea mai bună ASC 0,825 (95% CI 0,712 – 0,908), cu o sensibilitate de 69,7% și o specificitate de 75,7% (AFP > 6 ng/ml). AFP a fost cel mai specific marker unic (75,7%). Deși PIVKA a avut o sensibilitate mai bună decât AFP pentru diagnosticarea precoce al CHC, specificitatea a fost mai mică (60,6%) (PIVKA > 63mAU/ml) decât pentru AFP. Combinația celor doi biomarkeri (AFP > 6ng/ml și PIVKA > 63 mAU/mL) a avut o ASC de 0,867, care a fost superioară fiecărui marker individual, dar diferența nu a fost semnificativă statistic.

21. Un număr total de 182 de pacienți (116 cu hepatocarcinom și 66 cu ciroza hepatică) au fost înrolați în cadrul un studiu de tip caz control la Institutul Clinic Fundeni în perioada martie 2016 până în ianuarie 2019. Fiecare biomarker studiat a avut o distribuție diferită a nivelului seric și a intervalului de valori, astfel coeficientul de corelație pentru AFP și PIVKA a fost 0.107, în timp ce pentru AFP și GPC3 a fost 0.102, existând o bună corelație între AFP și AFP-L3, cu un coeficient de 0,51.

22. Pentru AFP ca marker unic am obținut o ASC a fost de 0.83, folosind algoritmul Youden, valoare cut-off a fost 6.07 ng/mL care este asociată cu o sensibilitate de 78% și o specificitate de 76%. Pentru PIVKA, ASC a fost de 0.756, obținută pentru o valoare cut-off de 74.4 mAU/mL, cu o sensibilitate de 81% și o specificitate de 61%. Valoarea ASC pentru AFP-L3 este de 0.66. Performanța optimă, conform metodei Youden este obținută pentru o sensibilitate de 93% și o specificitate de 44%, la o valoare de cut-off de 13.55 ng/mL. Valoarea ASC pentru GPC3 de 0.523, este apropiată de 0.50, biomarkerul neavând o valoare mare pentru diagnosticul de CHC. Performanța maximă, calculată cu ajutorul metodei Youden, este obținută pentru o valoare de cut-off de 466.00 ng/dL, cu o specificitate de 84% și o sensibilitate de 16%.

23. Combinația dintre AFP și PIVKA are o ASC de 0.887, cei 2 biomarkeri având o valoare diagnostica. Performanța optimă este la o sensibilitate de 82% și o specificitate de 81%. În urma calcului ratei de eroare a modelului regresiei logistice multivariate, am observat că o valoare AFP de peste 6.07 ng/mL crește de 9.11 ori probabilitatea de a avea carcinom hepatocelular, în vreme ce o valoare PIVKA de peste 74.64 mAU/mL crește de 4.79 ori probabilitatea de a avea carcinom hepatocelular.

24. În urma evaluării utilității diagnostice într-un sublot de pacienți cu CHC incipient (nodul unic cu diametrul sub 20mm), am observat că AFP ca marker unic prezintă o sensibilitate de 64% și o specificitate de 76% având cea mai bună ASC (0.70) dintre toți biomarkerii studiați. Combinația cu cea mai utilă, în același sublot, folosind doi biomarkeri a fost demonstrată a fi AFP asociat cu AFP-L3 (specificitate 64%, sensibilitate 91%).

25. Ca markeri de diagnostic pentru CHC, în cadrul sublotului de pacienți cu AFP normal ($<6.07\text{ng/mL}$) PIVKA a avut cea mai mare ASC (0.68) cu o sensibilitate de 72% și o specificitate de 64%. La același sublot de pacienți asocierea PIVKA cu AFP-L3 sau GPC3 nu a crescut suplimentar acuratețea diagnostică.

26. În ceea ce privește combinațiile triple de biomarkeri, combinația $\text{AFP} > 6.07\text{ng/mL}$, $\text{AFP-L3} > 13.55\text{ng/mL}$ și $\text{PIVKA} > 74.64\text{ mAU/mL}$ au avut cea mai bună sensibilitate (77%) cu o specificitate de 91%, similară asocierii dintre AFPL3 și PIVKA. Combinația dintre toți cei patru biomarkeri (AFP, AFP-L3, PIVKA și GPC3) a dus la o creștere nesemnificativă a sensibilității (79%) comparativ cu panelul de trei biomarkeri fără a îmbunătăți suplimentar acuratețea diagnostică.

Contribuțiile personale sunt reprezentate de:

- continuarea Registrului de Carcinom hepatocelular ce cuprinde date epidemiologie, clinice și terapeutice despre un număr important de pacienți cu această patologie, încă insuficient studiată; registrul permite colaborarea multicentrică prin înrolarea on-line a pacienților în România.
- studierea pentru prima dată în România a factorilor ce influențează obținerea unui răspuns complet, apariția recidivei și supraviețuirea unui lot semnificativ de pacienți din România tratați prin chemoembolizare transarterială, cea mai utilizată metodă de tratament a carcinomului hepatocelular la nivel mondial.
- studierea pentru prima dată în România a noi biomarkeri serologici pentru atât pentru diagnosticul carcinomului hepatocelular cât și pentru urmărirea post terapie a acestor pacienți.
- colectarea de probe sangvine de la pacienți din registru, pentru studii ale markerilor serologici, metabolomica, proteomica, ADN seric și tisular, microARN.

Direcții viitoare de cercetare pot fi:

- expansiunea registrului curent prin adăugarea continuă de noi pacienți și urmărirea periodică a celor deja incluși, cu participarea tuturor centrelor universitare din România
- Registrul va putea sta la baza realizării unor studii ulterioare în încercarea de a

identifica și alți factori prognostici care să ne ghideze în viitor abordarea terapeutică fiecărui pacient în parte.

- sunt necesare studii pe un număr mai mare de pacienți pentru a găsi cel mai util și cost-eficient panel de biomarkeri pentru diagnosticul hepatocarcinomului.
- includerea probelor biologice de la pacienții cu carcinom hepatocelular în bio-bănci, pentru a fi folosite în studii moleculare pentru determinarea biomarkerilor pentru diagnostic și urmărire post terapeutică.

BIBLIOGRAFIE

1. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):3-16. doi:10.1055/s-0030-1247128.
2. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level. *JAMA Oncol* 2017;3:1683–1691.
3. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142:1264–1273, e1.
4. Fact Sheets by Population-Globocan-IARC n.d. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (accesat in Decembrie, 2017)
5. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980–2004. *Hepatology* 2008;48:137–145.
6. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.GLOBOCAN 2012. (<http://globocan.iarc.fr>).
7. Thomas, M.B.;Abbruzzese, J.L. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 2005,23(31), 8093-108.
8. Bruix, J.;Llovet, J.M. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2002,35(3), 519-24.
9. Shi J, Zhu L, Liu S, et al. A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer* 2005;92:607- 612.
10. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65-73.
11. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168-174.
12. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, et al. Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1159-1164.
13. Omata M, Cheng A-L, Kokudo N, et al. Asia–Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatology International*. 2017;11(4):317-370.
14. Goodgame B, Shaheen NJ, Galanko J, et al. The risk of end stage liver disease and hepatocellular carcinoma among persons infected with hepatitis C virus: publication bias? *Am J Gastroenterol* 2003;98:2535-2542.
15. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* 2009;50:1142-1154.
16. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323-331.
17. Kanwal F, Kramer JR, Ilyas J, et al. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology* 2014;60:98- 105.
18. Turati F, Galeone C, Rota M, et al. Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 2014;25:1526-1535
19. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, et al. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:1972-1978.
20. Mittal S, Sada YH, El-Serag HB, et al. Temporal trends of non-alcoholic fatty liver disease related hepatocellular carcinoma in the veteran affairs population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:594-601.

-
21. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the U.S. *Gastroenterology* 2015;148:547-555.
 22. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* 2009;49:851-859.
 23. Alexander J, Torbenson M, Wu TT, et al. Non-alcoholic fatty liver disease contributes to hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver: a clinical and pathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:848-854.
 24. Mehal WZ. We are not in kansas anymore: The unfamiliar landscape of NASH. *Hepatology* 2016;63:682-684.
 25. Kew MC. The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Cancer* 2014;45:12-21.
 26. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2007;27(1):55-76. doi:10.1055/s-2006-960171.
 27. Yam JWP, Wong CM, Ng IO-L. Molecular and functional genetics of hepatocellular carcinoma. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2:117-134.
 28. Njei B, Rotman Y, Ditah I, et al. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality. *Hepatology* 2015;61:191-199
 29. Galle P.R., Forner A., Llovet et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma, European Association for the Study of the Liver (2018) *Journal of Hepatology*, 69 (1) , pp. 182-236.
 30. Singal A, Volk ML, Waljee A, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:37-47.
 31. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2006;101:513-523.
 32. Kim, T.;Murakami, T.;Takahashi, S.;Tsuda, K.;Tomoda, K.;Narumi, Y.;Oi, H.;Sakon, M.;Nakamura, H. Optimal phases of dynamic CT for detecting hepatocellular carcinoma: evaluation of unenhanced and triple-phase images. *Abdom Imaging*, 1999,24(5), 473-80.
 33. Baron, R.L.;Peterson, M.S. From the RSNA refresher courses: screening the cirrhotic liver for hepatocellular carcinoma with CT and MR imaging: opportunities and pitfalls. *Radiographics*, 2001,21 Spec No(S117-32.
 34. Harisinghani, M.G.;Hahn, P.F. Computed tomography and magnetic resonance imaging evaluation of liver cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 2002,31(3), 759-76, vi.
 35. Kew, M. Alpha-fetoprotein in primary liver cancer and other diseases. *Gut*, 1974,15(10), 814-21.
 36. Trevisani, F.;D'Intino, P.E.;Morselli-Labate, A.M.;Mazzella, G.;Accogli, E.;Caraceni, P.;Domenicali, M.;De Notariis, S.;Roda, E.;Bernardi, M. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol*, 2001,34(4), 570-5.
 37. Johnson, P.J. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 2001,5(1), 145-59.
 38. Shiraki, K.;Takase, K.;Tameda, Y.;Hamada, M.;Kosaka, Y.;Nakano, T. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Hepatology*, 1995,22(3), 802-7.

-
39. Wang, S.S.;Lu, R.H.;Lee, F.Y.;Chao, Y.;Huang, Y.S.;Chen, C.C.;Lee, S.D. Utility of lentil lectin affinity of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 1996;25(2), 166-71.
40. Marrero, J.A.;Feng, Z.;Wang, Y.;Nguyen, M.H.;Befeler, A.S.;Roberts, L.R.;Reddy, K.R.;Harnois, D.;Llovet, J.M.;Normolle, D.;Dalhgren, J.;Chia, D.;Lok, A.S.;Wagner, P.D.;Srivastava, S.;Schwartz, M. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2009;137(1), 110-8.
41. Bruix J, Sherman M: Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020-1022
42. Lencioni R, Cioni D, Della Pina C, Crocetti L, Bartolozzi C. Imaging diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2005;25:162-170.
43. Yu JS, Lee JH, Chung JJ, Kim JH, Kim KW. Small hypervascular hepatocellular carcinoma: limited value of portal and delayed phases on dynamic magnetic resonance imaging. *Acta radiol*. 2008;49:735-743.
44. Kojiro M, Wanless IR, Alves V, et al. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology*. 2009;49:658-664. doi:10.1002/hep.22709.
45. Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):17-25.
46. Llovet JM, Bru C BJ. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329-338.
47. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012;379(9822):1245-1255. doi:10.1016/S0140-6736(11)61347-0.
48. Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two Western centers. *Hepatology*. 2013;57(4):1426-1435.
49. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-442. doi:10.1053/jhep.2003.50047.
50. Burrel M, Reig M, Forner A, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol*. 2012;56(6):1330-1335.
51. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology*. 1999;29(1):62-67.
52. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378-390.
53. Llovet JM, Bru C BJ. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329-338.
54. Collier, J.;Sherman, M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1998,27(1), 273-8
55. Mazzaferro, V.;Regalia, E.;Doci, R.;Andreola, S.;Pulvirenti, A.;Bozzetti, F.;Montalto, F.;Ammatuna, M.;Morabito, A.;Gennari, L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*, 1996,334(11), 693-9.
56. Liu, C.L.;Fan, S.T.;Lo, C.M.;Chan, S.C.;Yong, B.H.;Wong, J. Safety of donor right hepatectomy without abdominal drainage: a prospective evaluation in 100 consecutive liver donors. *Liver Transpl*, 2005,11(3), 314-9.
57. Zimmerman A, Grand D, Charpentier KP. Irreversible electroporation of hepatocellular carcinoma: patient selection and perspectives. *J Hepatocell Carcinoma*. 2017;4:49-58.

-
58. Llovet, J.M.;Real, M.I.;Montana, X.;Planas, R.;Coll, S.;Aponte, J.;Ayuso, C.;Sala, M.;Muchart, J.;Sola, R.;Rodes, J.;Bruix, J. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002,359(9319), 1734-9.
59. Bruix, J.;Sala, M.;Llovet, J.M. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004,127(5 Suppl 1), S179-88.
60. Llovet, J.M.;Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 2003,37(2), 429-42.
61. Cerban R, Ester C, Iacob S, Grasu M, Pâslaru L, Dumitru R, et al. Predictive Factors of Tumor Recurrence and Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma treated with Transarterial Chemoembolization. *J Gastrointest Liver Dis*. 2018 Dec;27(4):409-417
62. Rimassa, L.;Santoro, A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009,9(6), 739-45.
63. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*. 1999;30:1434-1440. doi:10.1002/hep.510300629
64. Bogaerts J, Ford R, Sargent D, et al. Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria. *Eur J Cancer*. 2009;45(2):248-260.
65. Reig M, Darnell A, Forner A, Rimola J, Ayuso C, Bruix J. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: The Issue of Treatment Stage Migration and Registration of Progression Using the BCLC-Refined RECIST. *Semin Liver Dis*. 2014;34(04):444-455.
66. Srinivas, P.R.;Kramer, B.S.;Srivastava, S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol*, 2001,2(11), 698-704.
67. Gao F.J, Cui S.X, Chen M.H, Cheng Y.N, Sun L.R, Ward S.G, Kokudo N, Tang W, Qu X.J. Des-gamma-carboxy prothrombin increases the expression of angiogenic factors in human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci*, 2008,83(23-24), 815-20.
68. Uehara S, Gotoh K, Handa H, Tomita H, Senshuu M: Distribution of the heterogeneity of des-gamma-carboxyprothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1545- 1552.
69. Ohhira M, Ohtake T, Saito H, Ikuta K, Tanaka K, Tanabe H, Kawashima T, Fujimoto Y, Naraki T, Ono M, Kohgo Y: Increase of serum des-gamma-carboxy prothrombin in alcoholic liver disease without hepatocellular carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:67S-70S
70. Matsubara M, Shiraha H, Kataoka J, Iwamuro M, Horiguchi S, Nishina S, Takaoka N, Uemura M, Takaki A, Nakamura S, Kobayashi Y, Nouse K, Yamamoto K: Des-γ-carboxyl prothrombin is associated with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1602-1608.
71. Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 2002,62 Suppl 1(57-63.
72. Wang C.S, Lin C.L, Lee H.C, Chen K.Y, Chiang M.F, Chen H.S, Lin T.J, Liao L.Y. Usefulness of serum des-gamma-carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2005,11(39), 6115-9.
73. Farooq M, Hwang S.Y, Park M.K, Kim J.C, Kim M.K, Sung Y.K. Blocking endogenous glypican-3 expression releases Hep 3B cells from G1 arrest. *Mol Cells*, 2003,15(3), 356-60.
74. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, S.;Monji, M.;Komori, H.;Motomura, Y. et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16–25.

-
75. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:1403–7.
 76. Zynger D.L, Everton M.J, Dimov N.D, Chou P.M, Yang X.J. Expression of glypican 3 in ovarian and extragonadal germ cell tumors. *Am J Clin Pathol*, 2008,130(2), 224-30.
 77. Chen C, Huang X, Ying Z, et al. Can glypican-3 be a disease-specific biomarker?. *Clin Transl Med*. 2017;6(1):18.
 78. Ebied OM, Federle MP, Carr BI, et al. Evaluation of responses to chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;97:1042-1050.
 79. Golfieri R, Renzulli M, Mosconi C, et al. Hepatocellular carcinoma responding to superselective transarterial chemoembolization: an issue of nodule dimension? *J Vasc Interv Radiol* 2013;24:509-517.
 80. Kinugasa H, Nouse K, Takeuchi Y. et al. Risk factors for recurrence after transarterial chemoembolization for early-stage hepatocellular carcinoma, *J Gastroenterol* (2012) 47: 489.
 81. Nouse K, Ito Y, Kuwaki K, et al. Prognostic factors and treatment effects for hepatocellular carcinoma in Child C cirrhosis. *Br J Cancer* 2008;98:1161-1165.
 82. Ueno S, Tanabe G, Nuruki K, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma associated with Child class B and C cirrhosis in relation to treatment: a multivariate analysis of 411 patients at a single center. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:469-477.
 83. Arimura E, Kotoh K, Nakamuta M, Morizono S, Enjoji M, Nawata H. Local recurrence is an important prognostic factor of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:5601-5606.
 84. Park W, Chung YH, Kim JA, et al. Recurrences of hepatocellular carcinoma following complete remission by transarterial chemoembolization or radiofrequency therapy: focused on the recurrence patterns. *Hepatol Res* 2013;43:1304-1312.
 85. Raby N, Karani J, Michell M, Gimson A, Nunnerley H, Williams R. Lipiodol enhanced CT scanning in assessment of hepatocellular carcinoma. *Clin Radiol* 1989; 40: 480-485.
 86. Rou WS, Lee BS, Moon HS, Lee ES, Kim SH, Lee HY. Risk factors and therapeutic results of early local recurrence after transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2014;20:6995-7004.
 87. Riaz A, Ryu RK, Kulik LM, MuCHahy MF, Lewandowski RJ, Minocha J, Ibrahim SM, Sato KT, Baker T, Miller FH, et al: Alpha-fetoprotein response after locoregional therapy for hepatocellular carcinoma: oncologic marker of radiologic response, progression, and survival.
 88. Terzi E, Piscaglia F, Forlani L, et al. TACE performed in patients with a single nodule of Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:601.
 89. Douhara A, Namisaki T, Moriya K, et al. Predisposing factors for hepatocellular carcinoma recurrence following initial remission after transcatheter arterial chemoembolization. *Oncology Letters*. 2017;14(3):3028-3034.
 90. Jeong SO, Kim EB, Jeong SW, et al. Predictive Factors for Complete Response and Recurrence after Transarterial Chemoembolization in Hepatocellular Carcinoma. *Gut and Liver*. 2017;11(3):409-416.
 91. Kulik LM, Carr BI, MuCHahy MF, Lewandowski RJ, Atassi B, Ryu RK, Sato KT, Benson A 3rd, Nemcek AA Jr, Gates VL, Abecassis M, Omary RA, Salem R: Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008, 47:71–81
 92. Kim JH, Yoon HK, Kim SY, Kim KM, Ko GY, Gwon DI, Sung KB: Transcatheter arterial chemoembolization vs. chemoinfusion for unresectable hepatocellular carcinoma in patients with major portal vein thrombosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009, 29:1291–1298.

-
93. Luo J, Guo RP, Lai EC, Zhang YJ, Lau WY, Chen MS, Shi M: Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: a prospective comparative study. *Ann Surg Oncol* 2011, 18:413–420.
94. Englesbe M. J, Kubus J, Muhammad W, Sonnenday C. J, Welling T, Punch J. D, Lynch R. J, Marrero J. A, Pelletier S. J. (2010), Portal vein thrombosis and survival in patients with cirrhosis. *Liver Transpl*, 16: 83-90.
95. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Bresson-Hadni S, Meyer C, Gugenheim J, Durand F, Bernard PH, Boillot O, Boudjema K, Calmus Y, Hardwigsen J, Ducerf C, Pageaux GP, Dharancy S, Chazouilleres O, Dhumeaux D, Cherqui D, Duvoux C. Impact of pretransplantation transarterial chemoembolization on survival and recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005; 11: 767-775
96. Lesurtel M, Müllhaupt B, Pestalozzi BC, Pfammatter T, Clavien PA. Transarterial chemoembolization as a bridge to liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis. *Am J Transplant* 2006;6:2644-2650.
97. Terzi E, Ray Kim W, Sanchez W, Charlton MR, Schmeltzer P, Gores GJ, et al. Impact of multiple transarterial chemoembolization treatments on hepatocellular carcinoma for patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* 2015;21:248-257.
98. Song MJ, Park CH, Kim JD, Kim HY, Bae SH, Choi JY, Yoon SK, Chun HJ, Choi BG, Lee HG. Drug-eluting bead loaded with doxorubicin versus conventional Lipiodol-based transarterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: a case-control study of Asian patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 521-527
99. Song MJ, Chun HJ, Song DS, Kim HY, Yoo SH, Park CH, Bae SH, Choi JY, Chang UI, Yang JM, Lee HG, Yoon SK. Comparative study between doxorubicin-eluting beads and conventional transarterial chemoembolization for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 57: 1244-1250
100. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al (2010). AFP, AFP-L3, PIVKA, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of CHC. *J Gastroenterol*, 45, 1272-82
101. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al (2012). Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy using preoperative Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein. *Hepatol Res*, 42, 887-94
102. Park W. H., Shim J. H., Han S. B. et al., Clinical utility of des-gamma-carboxy-prothrombin kinetics as a complement to radiologic response in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization, *J Vasc Interv Radiol*, vol. 23, no. 7, pp. 927–936, 2012.
103. Lee Y. K., Kim S. U., Kimdo Y. et al., Prognostic value of alphafetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin responses in patients with hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization, *BMC Cancer*, vol. 13, article 5, 2013.
104. Kim MN, Kim BK, Han KH. Hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol* 2013;48:681–8.
105. **Cerban R**, Ester C, Iacob S, Paslaru L, Dumitru R, Grasu M, et al. Evaluation of tumor response using alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma patients who underwent transarterial chemoembolization. *Chirurgia (Bucur)*. 2018;113(4):524-533
- 106 Pote N, Cauchy F, Albuquerque M, Voitot H, Belghiti J, Castera L, et al. Performance of PIVKA for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion. *J Hepatol* 2015;62:848–54.

-
107. Mita Y, Aoyagi Y, Yanagi M, Suda T, Suzuki Y, Asakura H, et al. The usefulness of determining desgamma- carboxy prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1998;82:1643–8
 108. Choi JY, Jung SW, Kim HY, Kim M, Kim Y, Kim DG, et al. Diagnostic value of AFP-L3 andPIVKA in hepatocellular carcinoma according to total-AFP. *World J Gastroenterol* 2013;19:339–46.
 109. Hadziyannis E, Sialevris K, Georgiou A, Koskinas J. Analysis of serum alphafeto-protein-L3% and des-gamma carboxyprothrombin markers in cases with misleading hepatocellular carcinoma total alpha-fetoprotein levels. *Oncol Rep* 2013;29:835–9.
 110. Lim TS, Kim do Y, Han KH, Kim HS, Shin SH, Jung KS, et al. Combined use of AFP, PIVKA, and AFP-L3 as tumor markers enhances diagnostic accuracy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Scand J Gastroenterol* 2016;51: 344–53.
 111. Bertino G, Ardiri AM, Calvagno GS, Bertino N, Boemi PM. Prognostic and diagnostic value of des-g-carboxy prothrombin in liver cancer. *Drug News Perspect* 2010; 23(8): 498-508.
 112. Ismail S, Mayah W, Battia HE, Gaballah H, Jiman-Fatani A, Hamouda H, et al. Plasma nuclear factor kappa B and serum peroxiredoxin 3 in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(4): 1657-1663.
 113. Jeon Y, Jang ES, Choi YS, Kim JW, Jeong SH. Glypican-3 level assessed by the enzyme-linked immunosorbent assay is inferior to alpha-fetoprotein level for hepatocellular carcinoma diagnosis. *Clin Mol Hepatol.* 2016;22(3):359-365.

LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole publicate în reviste de specialitate

1. **R.C. Cerban**, A. Croitoru, I. Popescu, S. Iacob, C. Pietroreanu, V. Herlea, F. Botea, G. Becheanu, R. Dumitru, C. Gheorghe, I. Lupescu, L. Gheorghe. Management of Hepatic Epithelioid Haemangioendothelioma: 5 Year Single-Center Experience. Open Journal of Clinical and Medical Case Reports, Volume 3 (2017), Issue 15. DOI: 10.1016/S0168-8278(16)01341-6 <http://jclinmedcasereports.com/articles/OJCMCR-1294.pdf>
2. **Răzvan Cerban**, Carmen Ester, Speranța Iacob, Mihaela Ghioca, Liliana Paslaru, Radu Dumitru, Mugur Grasu, Georgiana Constantin, Irinel Popescu and Liliana Gheorghe. Evaluation of Alpha-fetoprotein and Prothrombin Induced by Vitamin K Absence for Hepatocellular Carcinoma Diagnosis in Patients Admitted to a Large Transplant Center. Surg. Gastroenterol. Oncol. 2018;23(6):391-398 DOI: 10.21614/sgo-23-6-391 <https://www.sgo-iasgo.com/article/evaluation-of-alpha-fetoprotein-and-prothrombin-induced-by-vitamin-k-absence-for-hepatocellular-carcinoma-diagnosis-in-patients-admitted-to-a-large-transplant-center>
3. **Răzvan Cerban**, Carmen Ester, Speranța Iacob, Mihaela Ghioca, Liliana Paslaru, Radu Dumitru, Mugur Grasu, Georgiana Constantin, Irinel Popescu and Liliana Gheorghe. Alpha-Fetoprotein, Alpha-Fetoprotein-L3, Protein Induced by Vitamin K Absence, Glypican 3 and Its Combinations for Diagnosis of Hepatocellular carcinoma. Surgery, Gastroenterology and Oncology, Vol. 24, Nr. 1, Feb 2019 Article DOI: 10.21614/sgo-24-1-37 <https://www.sgo-iasgo.com/article/alpha-fetoprotein.-alpha-fetoprotein-l3.-protein-induced-by-vitamin-k-absence.-glypican-3-and-its-combinations-for-diagnosis-of-hepatocellular-carcinoma>
4. **Cerban R**, Ester C, Iacob S, Grasu M, Pâslaru L, Dumitru R, Lupescu I, Constantin G, Croitoru A, Gheorghe L. Predictive Factors of Tumor Recurrence and Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma treated with Transarterial Chemoembolization. J Gastrointest Liver Dis. 2018 Dec;27(4):409-417. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.274.fcr. <http://www.jgld.ro/wp/archive/y2018/n4/a11/>
5. **Cerban R**, Ester C, Iacob S, Paslaru L, Dumitru R, Grasu M, et al. Evaluation of tumor response using alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma patients who underwent transarterial chemoembolization. Chirurgia (Bucur). 2018;113(4):524-533 <https://doi.org/10.21614/chirurgia.113.4.524> <http://revistachirurgia.ro/pdfs/2018-4-524.pdf>
6. Iacob S, **Cerban R**, Pietroreanu C, Ester C, Iacob R, Gheorghe C, Popescu I, Gheorghe L. 100% sustained virological response and fibrosis improvement in real-life use of direct acting antivirals in genotype-1b recurrent hepatitis C following liver transplantation. J Gastrointest Liver Dis. 2018 Jun;27(2):139-144. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.272.100. <http://www.jgld.ro/wp/archive/y2018/n2/a5/>

-
7. Ester C, **Cerban R**, Iacob S, Pietrareanu C, Constantin G, Paslaru L, Ichim S, Lita M, Vadan R, Grancea C, Ruta S, Gheorghe C, Popescu I, Gheorghe L. The Role of Beta-7 Integrin and Carbonic Anhydrase IX in Predicting the Occurrence of de Novo Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Liver Transplant Recipients. *Chirurgia (Bucur)*. 2018 Jul-Aug;113(4):534-541. doi: 10.21614/chirurgia.113.4.534. <http://revistachirurgia.ro/pdfs/2018-4-534.pdf>
8. Carmen Ester, **Razvan Cerban**, Speranta Iacob, Corina Pietrareanu, Mihaela Lita, Olteanu Ovidiu-Andrei, Simona Ichim, Georgiana Constantin, Liliana Paslaru, Camelia Grancea, Simona Ruta, Liana Gheorghe. Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk in Liver Transplant Recipients - Can Non-invasive Testing Change the Landscape? *Surg. Gastroenterol. Oncol.* 2018;23(6):386-390 DOI: 10.21614/sgo-23-6-386 <https://www.sgo-iasgo.com/article/metabolic-syndromeand-cardiovascular-risk-in-liver-transplant-recipients-can-non-invasive-testing-change-the-landscape>