

<sup>1</sup>Paweł Kozłowski, <sup>1</sup>Anna Parfieniuk-Kowerda, <sup>2</sup>Aleksander Tarasik, <sup>2</sup>Marcin Januszkiewicz,  
<sup>1</sup>Agnieszka Czauż-Andrzejuk, <sup>1</sup>Tadeusz Wojciech Łapiński, <sup>1</sup>Robert Flisiak

## OCCURRENCE AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN THE NORTH-EASTERN POLAND

### WYSTĘPOWANIE I CECHY KLINICZNE RAKA WĄTROBOWOKOMÓRKOWEGO U CHORYCH Z REGIONU PÓŁNOCNO-WŚCHODNIEJ POLSKI

<sup>1</sup>Medical University of Białystok, Department of Infectious Diseases and Hepatology

<sup>2</sup>Białystok Oncology Center, Department of Surgical Oncology with a Division of Pain Management

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii

<sup>2</sup>Białostockie Centrum Onkologii, Oddział Chirurgii Onkologicznej z Pododdziałem Leczenia Bólu

#### ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common malignancy and the third leading cause of cancer-related mortality worldwide. Risk factors for this malignancy include liver cirrhosis, HBV or HCV infection, fatty liver disease.

**THE AIM OF STUDY.** This study aims to assess the occurrence and clinical characteristics of HCC in the Northeastern Poland between 2011 and 2015. The number of primary lesions, their size and location within the liver were analysed. The risk factors for this cancer in studied population have been identified. The usefulness of AFP screening and imaging studies for the diagnosis of HCC were assessed. A preliminary analysis of the efficacy of anti-tumour therapy was performed.

**RESULTS.** Sixty-seven patients (28% female and 72% male) with diagnosed HCC were enrolled. HCC diagnosis was established according to the criteria proposed by the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Of the 67 patients in the study, 7 (10%) were aged 30 to 50 years and 60 patients (90%) were aged 51 years and older. During the period 2011-2015, an increase in HCC incidence was observed. In studied group the most prevalent (31%) were patients with 2 tumours localised in the 6th, 7th or 8th segments of the liver. Metastatic tumours were present in 15% and portal vein thrombosis in 9% of patients. Risk factors assessment revealed that in 72% of patients HCC coexisted with cirrhosis, 33% of patients were HCV-infected, 30% had HBV infection, and 15% were diagnosed with NASH. Elevated serum AFP level was observed in 83% of patients with liver cirrhosis, and in 58% of patients without cirrhosis ( $p < 0.05$ ). Liver transplantation was the best therapeutic option. The efficacy of ablation/resection in combination with sorafenib vs. ablation/partial resection was comparable.

**CONCLUSION.** There has been an increase in the number of HCC cases in North-eastern Poland in last few years. HCC is more common in men aged 50 years and older. Increased serum AFP level is a useful marker for the diagnosis and monitoring of HCC treatment in patients with liver cirrhosis.

**Key words:** *hepatocellular carcinoma (HCC), liver cirrhosis, HCV or HBV infection*

#### STRESZCZENIE

Rak wątrobowokomórkowy (HCC) to piąty, co do częstości występowania nowotwór złośliwy i trzeci, będący przyczyną śmierci wśród pacjentów z wszystkimi chorobami nowotworowymi. Czynnikiem ryzyka jest marskość wątroby, zakażenia HBV lub HCV, stłuszczenie wątroby.

**CEL.** Podjęto badania oceniające występowanie HCC wśród pacjentów z regionu północno-wschodniej Polski w okresie od 2011 do 2015 roku. Przeanalizowano ilość zmian pierwotnych, ich wielkość i lokalizację w odniesieniu do segmentów wątroby. Określono czynniki ryzyka występowania tego nowotworu. Oceniono przydatność AFP (alfa fetoproteiny) oraz badań obrazowych w diagnostyce HCC. Przeprowadzono wstępną analizę skuteczności stosowanej terapii przeciwnowotworowej.

**WYNIKI.** Badaniami objęto 67 chorych (28% kobiet i 72% mężczyzn) z HCC, u których rozpoznano ustalono stosując kryteria *International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia*. Nowotwór rozpoznano u 10% badanych chorych w wieku od 30 do 50 lat i u 90% powyżej 51 roku życia. W latach 2011-2015 obserwowano wzrost wykrywania HCC. Najczęściej (31%) obserwowano chorych z dwiema zmianami ogniskowymi zlokalizowanymi w segmentach 6, 7 lub 8 wątroby. U 15% chorych stwierdzono przerzuty nowotworu, a u 9% zakrzepicę żyły wrotnej. U 72% chorych HCC współistniał z marskością wątroby, u 33% z zakażeniem HCV, u 30% z HBV i u 15% z NASH. Wśród chorych z marskością wątroby podwyższone AFP stwierdzano u 83%, a wśród chorych bez marskości u 58% ( $p < 0.05$ ). Najlepsze efekty terapeutyczne obserwowano po przeszczepieniu wątroby. Skuteczność ablacji w połączeniu z sorafenibem lub częściową resekcją była porównywalna.

**PODSUMOWANIE.** HCC występuje częściej u mężczyzn, głównie po 50. roku życia. W ostatnich latach obserwuje się wzrost rozpoznania HCC. AFP (*alfa-fetoproteina*) jest przydatnym markerem w diagnostyce i monitorowaniu leczenia HCC u osób z marskością wątroby.

**Słowa kluczowe:** rak wątrobowokomórkowy (HCC), marskość wątroby, HCV, HBV

## INTRODUCTION

There is a growing incidence of HCC in Europe and worldwide. Liver cancer is the fifth most common malignancy and the third leading cause of cancer-related mortality (1). Early HCC diagnosis is crucial for the application of adequate treatment that can significantly reduce the mortality.

The presence of HCC is closely related to risk factors such as liver cirrhosis, HBV or HCV infection, alcoholic/non-alcoholic fatty liver disease. The highest prevalence of HCC is reported in developing countries. However, there is a rapidly growing incidence of HCC in the developed regions of the world. Hepatocellular carcinoma is a heterogeneous tumour which development results from genetic and epigenetic factors, activation of cellular proto-oncogenes and inhibition of tumour suppressor genes (2). Activation of stellate liver cells (HSC) is the first step in the development of liver fibrosis. HSC secrete transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) and epidermal growth factor (EGF) which results in paracrine stimulation of the proliferation of hepatocytes in liver regeneration. HSC release cytokines that trigger hepatic fibrogenesis, which eventually results in liver cirrhosis. These processes are responsible for the formation of HCC in cirrhotic liver.

Following HBV infection, the genome of the virus (partially double-stranded, circular but not covalently closed DNA) is transported to the nucleus of hepatocytes where it converts to a plasmid-like structure of covalently closed circular DNA (cccDNA). Linear forms of relaxed circular genome of HBV in the nucleus are precursors for the integration. There is accumulating data showing that HBV DNA sequences can integrate with host DNA across all human chromosomes. The integration of HBV DNA sequences at the genes connected to the carcinogenesis in host DNA drives the development

## WSTĘP

W ostatnich latach w Europie obserwuje się wzrost częstości występowania raka wątrobowokomórkowego (HCC). Na świecie jest to piąty, co do częstości występowania nowotwór złośliwy i trzeci, jako przyczyna śmierci pacjentów z różnymi chorobami nowotworowymi (1). Wczesna diagnostyka tego nowotworu jest kluczowa w rozpoczęciu terapii mogącej istotnie zmniejszyć śmiertelność pacjentów.

Występowanie HCC wykazuje ścisły związek z czynnikami ryzyka, takimi jak marskość wątroby, zakażenia HBV lub HCV, stłuszczenie wątroby. HCC występuje najczęściej w krajach rozwijających się, jednak w krajach rozwiniętych obserwuje się aktualnie szybki trend wzrostowy występowania tego nowotworu. Rak wątrobowokomórkowy jest guzem niejednorodnym, a procesy jego powstawania związane są z uwarunkowaniami genetycznymi, epigenetycznymi, aktywacją onkogenów komórkowych, jak i inaktywacją genów supresorowych nowotworu (2). Aktywacja komórek gwiazdzistych wątroby (HSC) jest pierwszym etapem w włóknieniu wątroby. HSC nasilają zmiany rozrostowe, aktywują cytokiny i procesy fibrynogenezy prowadzące do włóknienia, a następnie marskości wątroby. To głównie te procesy są odpowiedzialne za powstawanie HCC wśród chorych z marskością wątroby (3).

U pacjentów zakażonych HBV, DNA wirusa wnika do jądra hepatocytów, w którym ulega replikacji. Powstające tam nowe cząstki DNA mogą tworzyć zamknięte kowalencyjnie koliste formy DNA (cccDNA) oraz integrować się z DNA gospodarza. Wirusowe DNA wykazuje bardzo niewielkie możliwości naprawcze. Integracja zmienionego DNA wirusa z kwasem deoksyholowym gospodarza stymuluje syntezę pierwotnych komórek nowotworowych oraz hamuje w nich procesy apoptozy. Integrację DNA wirusa z ludzkim DNA stwierdza się u 85-90% pacjentów zakażonych HBV z rozpoznaniem HCC. Przedłużają-

of the cancer. This process results in upregulation of host genes responsible for the cell proliferation or downregulation of tumour suppressor genes thus altering apoptotic cell death. The integration of HBV DNA sequences into human DNA is observed in 85-90% of HCC occurring in HBV- infected patients. The persistent HBV infection significantly increases the probability of the integration of viral DNA into the host deoxyribonucleic acid (4). There is an evidence for the carcinogenic effects exerted by HBx and HBs proteins of the pre-S mutants (5). HBx protein affects the stability of human genomic DNA by upregulating DNA methyltransferases. HBV X-protein can also inhibit tumour suppressor protein p53 thus disabling controlled apoptotic cell death (6). HBx protein induces the hepatic steatosis, which is considered as a detrimental predictive factor for HCC development (7). There is growing evidence that mutations within various HBV DNA genes (including mutations in the viral polymerase gene) may initiate the development of HCC. The mutations at the region A1762T/G1764A encoding HBV core protein seem to have an impact on hepatic carcinogenesis (8).

Hepatocellular carcinoma in chronic HCV infection occurs almost exclusively in patients with advanced cirrhosis (9). There is incomplete data on how the HCV infection promotes liver carcinogenesis. In contrast to HBV infection, HCV RNA does not integrate with the host genome. Viral proteins encoded by HCV RNA influence cell cycle by augmenting proliferation and suppressing apoptosis thus promoting HCC development. Viral core protein modulate the activity of p53 and p73 tumour suppressor cellular proteins which are responsible for activation of apoptotic cell death, growth arrest by holding the cell cycle, activation of DNA repair proteins and stabilization of gene structures, as well as inhibition of angiogenesis (10). Viral core protein can also downregulate E-cadherin expression at the transcriptional level. E-cadherin molecule regulates cell activity and adherence to neighbouring cells, it is responsible for the maintenance of tissue architecture, is it also considered a potent tumour suppressor as it can inhibit the growth of abnormal cells (11). HCV core protein modulate the activity of the transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) which regulates the proliferation, differentiation and apoptosis of hepatocytes. There is an evidence that HCV core protein may switch TGF- $\beta$  responses toward tumour promotion (12). HCV non-structural NS3 protein indirectly activates carcinogenesis by transcriptional suppression of p21(WAF1) promoter, inhibition of p53 protein function and upregulation of TNF- $\alpha$  expression (13, 14). Carcinogenic effects exerted by NS5A HCV protein include suppression of p53 and inhibition

cy się czas zakażenia HBV w sposób istotny zwiększa prawdopodobieństwo integracji DNA wirusa z DNA gospodarza (4). Jednym z najistotniejszych procesów stymulacji powstawania HCC jest integracja sekwencji kodujących białko X i pre-S2 z DNA gospodarza (5). Proteiny HBx wpływają na nasilenie niestabilności genetycznej wirusowego DNA, a ponadto stymulując p53 hamują procesy apoptozy (6). Proteina X stymuluje również procesy stłuszczenia wątroby, które uznawane są za czynnik sprzyjający rozwojowi HCC (7). Również mutacje w obrębie różnych fragmentów DNA HBV (w tym mutacje syntezy polimerazy) mogą inicjować powstawanie pierwotnych zmian nowotworowych. Wśród ważniejszych są mutacje w obrębie regionu A1762T/G1764A kodującego rdzeń wirusa (8).

Rak wątrobowokomórkowy w zakażeniu HCV występuje prawie wyłącznie u chorych z rozwiniętą marskością wątroby (9). Wiedza na temat wpływu zakażenia HCV na rozwój raka wątrobowokomórkowego jest niepełna. W odróżnieniu do zakażenia HBV, RNA tego wirusa nie integruje się z genomem gospodarza. Zakażenie HCV predysponuje do powstawania HCC głównie na drodze stymulacji syntezy specyficznych białek wykazujących zdolność przekształceń komórkowych, jak i hamowanie apoptozy. Białka rdzeniowe wirusa modulują aktywność komórkowych białek p53 i p73. Białka te są odpowiedzialne za mechanizmy przeciwnowotworowe, aktywację apoptozy, stabilizację struktur genowych oraz hamowanie angiogenezy (10). Proteiny rdzeniowe wirusa mogą hamować specyficzne proteiny E-cadherin, które są odpowiedzialne za regulację aktywności komórki, przyleganie do komórek sąsiednich oraz hamowanie rozwoju i wzrostu nieprawidłowych komórek (11).

Białka rdzeniowe HCV stymulują syntezę, a w konsekwencji wzrost stężenia transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  kontroluje proliferację oraz różnicowanie w większości typów komórek. Dysregulacja syntezy tej proteiny może inicjować wystąpienie zmian nowotworowych (12). Białko NS3 HCV aktywuje pośrednio wzrost nowotworów poprzez hamowanie promotora p21WAF1, hamowanie funkcji białka p53 oraz indukcję syntezy TNF- $\alpha$  (13, 14). Białko NS5A bierze czynny udział w mechanizmach hamowania apoptozy na drodze blokady aktywacji p53, kaspazy-3, Bax i Bcl-2 co również sprzyja rozwojowi zmian nowotworowych (15, 16).

Efekt wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego wśród chorych z przewlekłym zakażeniem HCV pośrednio nasila powstawanie komórek inicjujących pojawienie się HCC. Powoduje również modulację, a w efekcie deregulację wytwarzania w komórkach gospodarza różnych cytokin i enzymów. Skutkiem tego może dochodzić do uszkodzenia DNA gospodarza i jego mutacji (17). Ponadto, wśród zakażonych

of apoptotic cell death, blockade of downstream caspase-3, inactivation of proapoptotic Bax protein and Bcl-2, which also favours the development of neoplastic lesions (15, 16). Moreover, intracellular oxidative stress accompanying HCV infection favours the malignant transformation of hepatocytes. It can also modulate the function of cellular enzymes and various cytokines which eventually results in damage and accumulation of mutation in cellular (nuclear, mitochondrial) DNA (17). Additionally, induced autophagy in HCV infection leads to survival of malignant cells in hypoxic, with low energy supply conditions (18). The epidemiological data shows that hepatic steatosis is more prevalent in G3 HCV-infection compared to other HCV genotypes. It seems that G3 HCV-infection is linked with the higher incidence of HCC (19). There is cumulating data showing that incorrect lipid biosynthesis processes (*de novo* lipogenesis) stimulates the neoplastic transformation of hepatocytes. There are studies suggesting that the inhibition of fatty acid synthase (FASN) by targeting the upstream regulatory factors and enzymes involved in *de novo* lipogenesis inhibits the growth of HCC. However, the data is debatable as other studies suggest that the formation of HCC can be independent of lipogenesis processes (20).

#### AIM OF STUDY

This study aims to assess the occurrence and clinical characteristics of HCC in the North-eastern Poland between 2011 and 2015. The number of primary lesions, their size and location within the liver were analysed. The risk factors for this cancer in studied population have been identified. The usefulness of AFP screening and imaging studies for the diagnosis of HCC were assessed. A preliminary analysis of the efficacy of anti-tumour therapy was performed.

#### MATERIALS AND METHODS

Sixty-seven patients diagnosed with HCC were enrolled in this study. The HCC diagnosis was established by the imaging studies, mainly a four-phased CT scans. The biopsy (fine needle aspiration biopsy or core needle biopsy) of liver focal lesions was done for the confirmation of the diagnosis in 58 (87%) patients. The obtained samples were sent for cytological or histopathological evaluation. The criteria of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (21) and the Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) algorithm (22) were used for diagnosis, clinical staging and selection of the treatment method.

HCV występują silne procesy autofagii prowadzące (wbrew swoim zamiarom) do przeżycia komórek nowotworowych w autofagosomach (18). Wśród zakażonych HCV genotypem 3 (G3) znacznie częściej niż u pacjentów zakażonych innymi genotypami dochodzi do stłuszczenia wątroby. W tej samej grupie chorych częściej obserwuje się pojawianie HCC (19). Nieprawidłowa biosynteza lipidów (*de novo* lipogeneza) pobudza nowotworzenie. W badaniach doświadczalnych wykazano, że zahamowanie syntetazy kwasów tłuszczowych (FASN) poprzez wpływ na enzymy odpowiedzialne za *de novo* lipogenezę, hamuje wzrost HCC. Jednak inne badania sugerują, że powstawanie HCC może być niezależne od *de novo* lipogenezy (20).

Celem podjętych badań była ocena występowania HCC wśród pacjentów z regionu północno-wschodniej Polski w okresie od 2011 do 2015 roku. Przeanalizowano lokalizację zmian pierwotnych, ich wielkość, obecność zmian przerzutowych. Określono korelację pomiędzy czynnikami ryzyka a występowaniem HCC. Oceniono przydatność AFP w diagnostyce HCC. Przeprowadzono wstępną analizę skuteczności stosowanej terapii przeciwnowotworowej.

#### BADANI CHOROZY I METODY BADAŃ

Badaniami objęto 67 chorych z HCC. Rozpoznanie ustalono głównie na podstawie wyniku czterofazowej tomografii komputerowej wątroby. U 58/67 wykonano biopsję cienko- lub gruboigłową zmiany ogniskowej oceniając zmiany cytologiczne lub histopatologiczne w uzyskanym biopacie.

U chorych określono stężenie AFP w surowicy metodą elektrochemiluminescencyjną przy wykorzystaniu odczynników ROCHE (Niemcy) i aparatu COBAS e 601. Ponadto przeprowadzono badania określające zakażenie HBV lub HCV. Wśród zakażonych HBV określano wiramię HBV-DNA. U pacjentów zakażonym HCV określono genotyp wirusa.

Podjęto próbę oceny stosowanej terapii określając okres przeżycia chorych bez leczenia oraz przy zastosowaniu różnych metod terapeutycznych.

#### WYNIKI

Rozpoznanie raka wątrobowokomórkowego ustalono na podstawie spełnienia u pacjentów kryteriów zalecanych przez *International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia* (21) oraz *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) (22). U wszystkich chorych wykazano obecność zmian nowotworowych o wielkości powyżej 10 mm, które w wykonanej tomografii komputerowej po podaniu środka kontrastowego silnie wzmacniały się w fazie tętnicznej oraz ulegały wyplukiwaniu kontrastu w fazie żyłnej. U 58/67 (87%) chorych rozpoznanie potwierdzono badaniem cytologicznym lub histopatologicznym.

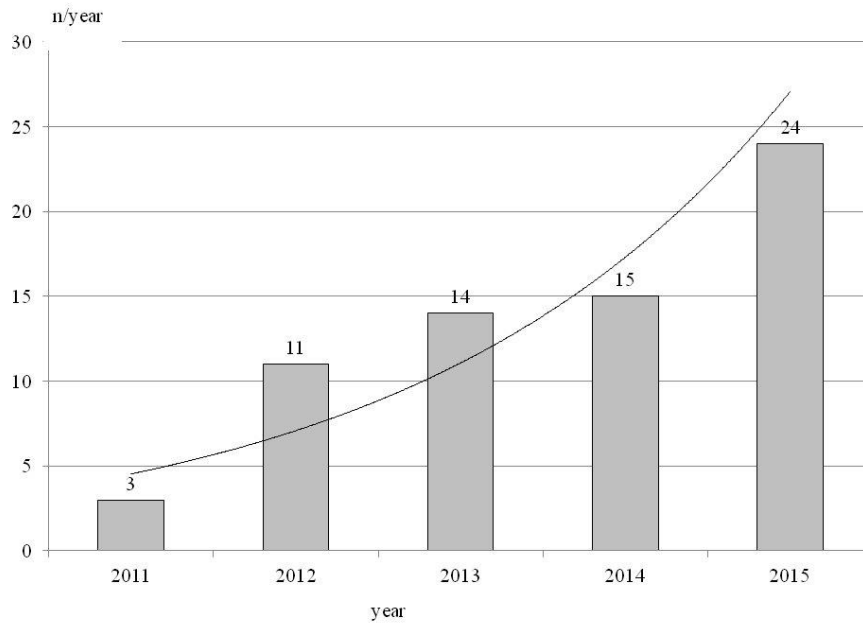


Fig. 1. Number of patients diagnosed with HCC in 2011-2015

Ryc. 1. Liczba chorych z rozpoznaniem HCC w latach 2011-2015

Serum AFP levels were routinely assessed by electrochemiluminescence sandwich immunoassays (ECLIA) with COBAS e 601 diagnostic platform (Roche Diagnostics, Germany).

Patients were tested for factors, including HBV or HCV infection. In HBV-infection the viral load was assessed. In HCV infection viral load and genotype were determined.

W grupie 67 pacjentów z HCC było 28% (19) kobiet i 72% (48) mężczyzn w średnim wieku 64,6 roku (od 30 do 82 roku życia). Nowotwór rozpoznano u 90% (60) chorych w wieku powyżej 51 roku życia. HCC wystąpił u 10% (7) w wieku od 30 do 50 roku. U 48/67 (72%) chorych rak wątrobowokomórkowy współistniał z marskością wątroby, a średni czas jej trwania wynosił 3,2 roku (od 1 do 10 lat).

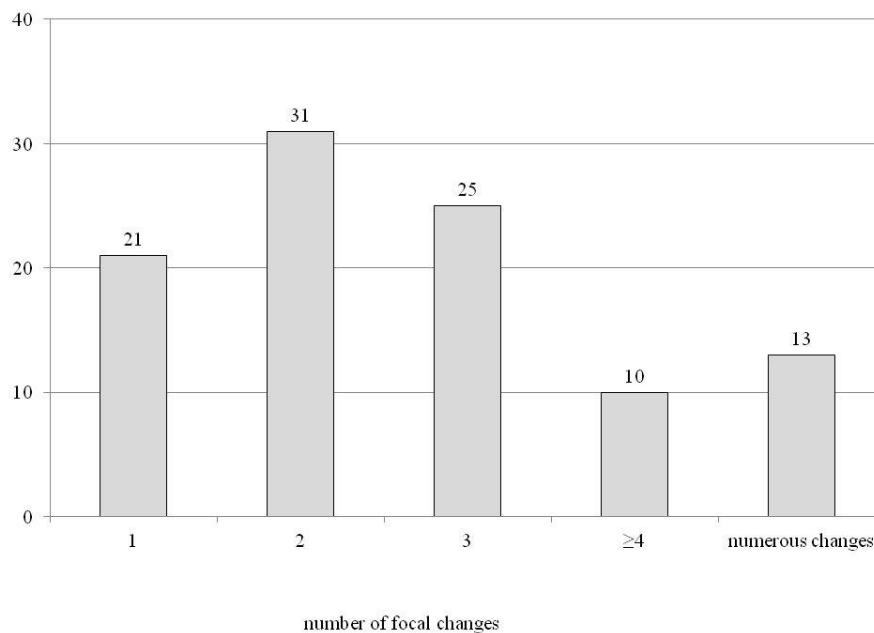


Fig. 2. Number of primary HCC focal lesions in patients' liver.

Ryc. 2. Liczba zmian ogniskowych HCC w wątrobie badanych chorych

The time of survival was determined to evaluate the applied treatment methods with comparison to the group without any specific treatment.

W latach od 2011 do 2015 roku obserwowano systematyczny wzrost liczby pacjentów z HCC (Ryc. 1). W grupie leczonych chorych, najczęściej obserwowano

## RESULTS

All patients had liver tumour lesions over 10 mm in diameter at the time of diagnosis. The characteristic radiological features, hyperenhancement in the late arterial phase and hypoattenuation (rapid contrast “washout”) in portal venous phase were observed in imaging studies, mainly a four-phased CT scans. In 58/67 (87%) patients the diagnosis was confirmed by cytological or histopathological examination of liver biopsy samples.

dwie zmiany ogniskowe w wątrobie (31%), (Ryc. 2). Najczęściej, u ponad 30% chorych zmiany ogniskowe lokalizowały się w segmentach 6, 7 lub 8 wątroby (39%; 34%; 33%), najrzadziej w segmencie 1 (3%), (Ryc. 3).

U 10 z 67 leczonych pacjentów (15%) stwierdzono przerzuty nowotworu do węzłów chłonnych i płuc, a u 6 (9%) pacjentów chorobie towarzyszyła zakrzepica żyły wrotnej.

Najważniejszym czynnikiem ryzyka HCC była marskość wątroby, którą stwierdzono u 48 (72%) pacjentów. Zakażenie HCV było kolejnym czynnikiem współwystępującym z HCC (33%). U 5 chorych zakażonych HCV i 4 HBV z współistniejącym HCC nie stwierdzono marskości wątroby (Tab.1).

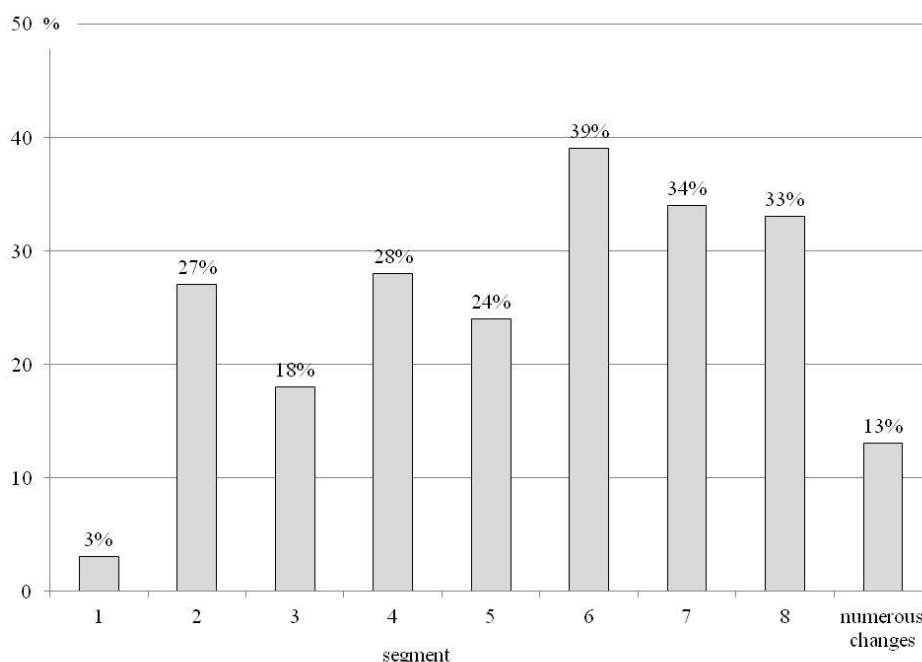


Fig. 3. Frequency of focal lesions in relation to liver segments

Ryc. 3. Częstość występowania zmian ogniskowych HCC w poszczególnych segmentach wątroby

Among 67 patients diagnosed with HCC, 28% (19 pts) were female and 72% (48 pts) were male, mean age 64.6 yrs (range: 30 - 82 yrs). Of the 67 patients in the study, 7 (10%) were aged 30 to 50 years and 60 patients (90%) were aged 51 years and older. In 48/67 (72%) of patients HCC coexisted with liver cirrhosis. The average time of follow up since the established diagnosis of liver cirrhosis was 3.2 years (range: 1 - 10 yrs). A gradual increase in the number of patients diagnosed with HCC was observed in period 2011 - 2015 (Fig. 1).

In studied group the most prevalent (31%) were patients with 2 tumours (Fig. 2). The most frequent localisation of malignant lesions were 6th, 7th or 8th segments of the liver, 39%, 34% and 33% of liver lesions consecutively. The lowest frequency of HCC lesions was reported in liver segment 1 (3%) (Fig.3).

Metastatic tumours, localised in lymph nodes and

U 4 (18%) chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C I HCC stwierdzono zakażenie HCV genotypem 3a, u 2 (9%) genotypem 4, a u 16 (73%) genotypem 1b.

Wśród 20 pacjentów zakażonych HBV u 7 (35%) nie stwierdzano wirerii we krwi. Chorzy ci byli leczeni przeciwwirusowo. U 5 z tych pacjentów rozpoznano marskość wątroby, a u 2 pozostałych, włóknienie było na poziomie F3 w skali Metavir.

W grupie chorych z marskością wątroby podwyższone AFP stwierdzano u 83%, a u pacjentów bez marskości znamienne rzadziej bo u 58% ( $p < 0.05$ ).

Do terapii przeciwnowotworowej nie zakwalifikowano 17 z 67 (25%) chorych. Powodem dyskwalifikacji były przeciwwskazania do zabiegów chirurgicznych, ablacji lub brak kryteriów pozwalających rozpocząć chemioterapię. Przebieg choroby wśród tej grupy

lungs, were present in 10/67 (15%) and portal vein thrombosis in 6/67 (9%) of patients.

Risk factors assessment revealed that most important risk factor for HCC development was liver cirrhosis, which was diagnosed in 48 (72%) patients. The second underlying condition coexisting with HCC was HCV infection affecting 22/67 (33%) patients. In HCV or HBV infected group, only 5 patients with HCV and 4 patients with HBV infection had excluded the diagnosis of liver cirrhosis (Tab.1).

The most prevalent HCV genotype in was G1b detected in 16/22 (73%) patients, followed by G3a in 4/22 (18%) patients and G4 in 2/22 (9%) patients.

In group of 20 HBV-infected patients, only 7/20 (35%) had undetectable HBV DNA in blood serum due to antiviral treatment with nucleotide/nucleoside analogues. However, fibrosis assessment confirmed liver cirrhosis in 5 patients with undetectable viremia, while the other two had F3 fibrosis according to Metavir staging classification.

Elevated serum AFP level was observed in 83% of patients with liver cirrhosis, and it was significantly less frequent in patients without cirrhosis - 58% ( $p < 0.05$ ).

Liver transplantation was the best therapeutic option for HCC. The efficacy of ablation/resection in combination with sorafenib vs. ablation/partial resection was comparable (Tab. 2). In studied group 17/67 (25%) patients were not eligible for specific anti-cancer therapy. The reasons for the disqualification were the contraindications to surgical procedures, ablation or failure to meet the criteria for starting chemotherapy. The course of the disease in these patients was rapid and dramatic. The average life expectancy was twice as short as the patients treated for HCC.

## DISCUSSION

In studied group we reported higher incidence of HCC in male vs. female patients, which is in accordance with the current epidemiological data. Additionally, HCC was more common in patients aged 50 years and older (23).

Liver cirrhosis, irrespective of the aetiology, is the most important risk factor for HCC development. Predominant data report that liver cirrhosis affects 80-90% of patients with HCC (9, 24). In our studied population this proportion was slightly lower and pertained to 72% of the patients.

HBV and HCV infections are important risk factors for primary liver cancer. In developing countries HBV infection accounts for 60% of primary liver cancers. On the other hand, in developed countries, HCV infection is more common underlying risk factor for HCC (25). We have found HCV infection in 33% of the studied population, whereas HBV infection was confirmed in 30% of patients with HCC. Higher incidence of HCC with underlying HBV infection can be explained by the persistently high incidence of chronic HBV infection in Poland (26).

pacjentów był szybki i dramatyczny. Średni czas życia był dwukrotnie krótszy w porównaniu do chorych leczonych. Najlepsze efekty terapeutyczne obserwowano po przeszczepieniu wątroby. Skuteczność pozostałych metod leczenia była porównywalna (Tab.2).

Table I. Prevalence of selected risk factors among HCC patients

Tabela I. Częstość występowania czynników ryzyka HCC wśród badanych chorych

Risk factor	n (%)
HCV infection	22 (33%) M+17 (77%)
HBV infection	20 (30%) M+16 (80%)
Alcoholic liver cirrhosis	15 (22%)
NASH	10 (15%)
All patients with liver cirrhosis	48 (72%)

M+ - patients with liver cirrhosis

## DYSKUSJA

Wyniki badań własnych, podobnie jak obserwacje innych badaczy wskazują na zdecydowanie częstsze występowanie HCC wśród mężczyzn w porównaniu do kobiet. Ponadto, rak wątrobowokomórkowy występuje najczęściej u pacjentów po 50 roku życia (23).

Marskość wątroby, niezależnie od jej etiologii jest najpoważniejszym czynnikiem ryzyka powstawania HCC. Większość autorów stwierdza obecność marskości wątroby u 80-90% pacjentów z HCC (9, 24). W naszych badaniach odsetek ten był nieco mniejszy i wynosił 72% chorych.

Zakażenia HBV i HCV to istotne czynniki ryzyka raka pierwotnego wątroby. W krajach rozwijających się zakażenie HBV współistnieje u 60% chorych z rakiem pierwotnym wątroby. Jednak w krajach rozwiniętych znacznie częściej zakażenie HCV występuje u pacjentów z HCC (25). W naszych badaniach współistnienie HCC z zakażeniem HCV stwierdzono u 33%, zaś HBV u 30% chorych.

Częste zakażenie HBV współistniejące z HCC w Polsce można tłumaczyć utrzymującą się wysoką liczbą chorych przewlekle zakażonych tym wirusem (26). Wyniki wskazujące, że wśród zakażonych HCV u 73% stwierdzano zakażenie genotypem 1b, a u 18% genotypem 3a, korelują z porównywalną częstością zakażenia wymienionymi genotypami wśród całej populacji zakażonych. Wprawdzie ocenia się, że HCC występuje częściej wśród zakażonych genotypem 3 HCV, jednak nasze obserwacje tego nie potwierdzają (jakkolwiek grupa pacjentów nie jest duża).

Table II. Efficacy of anti-cancer management  
 Tabela II. Skuteczność leczenia przeciwnowotworowego

type of therapy	n	deaths (%)	follow up (months) mean $\pm$ SD	number of focal lesions in the liver (mean)	the diameter of a single focal change (mm)
no specific treatment	17	12 (71%)	9 $\pm$ 5	2,5 in 5 patients numerous focal lesions	35 $\pm$ 21
thermoablation or chemoablation	9	1 (11%)	20 $\pm$ 7	2	20 $\pm$ 17
thermoablation or chemoablation and sorafenib	5	1 (20%)	21 $\pm$ 8	2	44 $\pm$ 21
sorafenib	22	15 (68%)	17 $\pm$ 6	2,8 in 2 patients numerous focal lesions	31 $\pm$ 12
partial resection of the liver	12	1 (8%)	22 $\pm$ 14	1,6	28 $\pm$ 10
liver transplantation	2	0	14 and 36	1	32 $\pm$ 15

The frequency of HCV genotypes in our study, i.e. 73% of G1b and 18% of G3a infections, reflect the distribution of HCV genotypes in north-eastern Poland. Although it is estimated that HCC is more common in G3 HCV infection, we did not observed such associations in studied population. However, our results may be biased by the limited number of patients with G3 HCV infection.

Increased serum AFP level can be found in 80% children and 70% adults diagnosed with HCC. The absence of AFP synthesis is probably related to the deficiencies of tissue-specific transcriptional regulators in tumour cells (27). Clear cell HCC (CC-HCC) is a histopathological variant of HCC, which accounts for up to 37% of all HCC. Clear cells (CC) may compose over 50% of tumour mass. Their histopathological features may result from the presence of glycogen or lipid droplets in the cytoplasm. These tumour cells escape from the systemic immune responses. Tumour markers such as panCK, MOC31, pCEA (polyclonal carcinoembryonic antigen), synaptophysin, chromogranin, EMA (epithelial membrane antigen), vimentin, S-100, HMB-45 (Human melanoma black-45), CD10, CK7 (Cytokeratin 7), CK20 (Cytokeratin 20), ubiquitin and AFP are often negative in CC-HCC (28). Another variant of primary liver cancer is fibrolamellar liver cancer (FLC). This tumour usually emerge in patients without underlying liver cirrhosis. Low serum tumour markers, including AFP are characteristic for this type of HCC. Immunohistochemical staining cannot differentiate FLC from typical HCC. Highly differentiated FLC cells express hepatocellular differentiation markers and biliary differentiation markers (cytokeratin 7), as well as CD99 (29). Considering low serum AFP often confirmed among patients without cirrhosis, the question then arises as to how often CC-HCC or FLC occurred among the analysed patients. At present, electron microscopy evaluation of the tumour samples can ascertain a diagnosis of CC-HCC and FLC (30). Therefore, there is obvious need for the

Wysokie stężenie AFP występuje u około 80% dzieci i 70% dorosłych chorych z HCC. Brak syntezy AFP w komórkach nowotworowych jest prawdopodobnie związane z niedoborami w tych komórkach tkankowo specyficznych regulatorów transkrypcji (27).

Jednym z wariantów HCC jest CC-HCC występujący do 37% wszystkich raków wątrobowokomórkowych. Komórki jasne (CC) często stanowią powyżej 50% masy guza, a ich zmieniona budowa może wynikać z obecności glikogenu lub lipidów w cytoplazmie. Guzy te są niereaktywne immunologicznie. Oceniane w tych guzach markery nowotworowe, takie jak panCK, MOC31, pCEA (*polyclonal carcinoembryonic antigen*), synaptophysin, chromogranin, EMA (*epithelial membrane antigen*), vimentin, S-100, HMB-45 (*Human melanoma black-45*), CD10, CK7 (cytokeratin 7), CK20, ubiquitin oraz AFP są ujemne (28).

Innym wariantem raka pierwotnego wątroby jest rak włóknisto-blaszkowy (FLC). Nowotwór ten występuje zazwyczaj u pacjentów bez marskości wątroby, charakteryzuje się również brakiem wzrostu markerów nowotworowych, w tym AFP (29). Biorąc pod uwagę często występujący ujemny AFP wśród badanych chorych bez marskości wątroby nasuwa się pytanie, jak często CC-HCC lub FLC występowały wśród analizowanych pacjentów. Aktualnie jedyną możliwością pewnego rozpoznania CC-HCC FLC jest ocena morfologiczna guza z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (30).

Coraz częściej poszukuje się nowych, nieinwazyjnych wskaźników rozwoju HCC. Yamaguchi i wsp. podjęli próbę rozdziału elektroforetycznego białek występujących w HCC. Zidentyfikowali 1 623 białka, z czego za najbardziej istotne w diagnostyce wczesnych zmian uznali TGM2 (Transglutaminazę 2) (31).



new, non-invasive tumour markers for HCC. Yamaguchi et al. attempted to identify proteins present in HCC. They performed electrophoretic separation of 1623 HCC proteins, of which TGM2 (Transglutaminase 2) was the most relevant for early diagnosis (31). The dynamic development of diagnostic technique, for instance the Raman spectroscopy technique (based on the phenomenon of inelastic scattering of photons), enables the identification of the characteristic peaks in metabolic spectra thus allowing to predict the development of HCC (32). However these brand new methods are not widely available and there is obvious need for further development these techniques before application in the field of medical science. Perhaps identification of new tumour marker proteins or application of Raman spectroscopy will allow in the future to differentiate between various histopathological types of HCC.

About 10% of HCC tumours develop in non-cirrhotic livers. There are reports showing that malignant lesions emerging in non-cirrhotic livers are typically larger in size comparing to malignant tumours in cirrhotic livers (33). We have not found any significant differences in radiological appearance of malignant lesions in patients with and without liver cirrhosis. However, this could be attributed to the limited number of HCC patients without liver cirrhosis in our study.

Hepatocellular carcinoma was most common in the liver in segments 6, 7 or 8, the least in 1 and 3. The cause of this distribution is not understood. These observations indicate the need for special attention in case of focal lesions occurring in the segments in which the tumor most often occurs.

There are constant difficulties in application of the revised in 2016 standards and results of clinical trials on management of HCC in clinical practice. The main factors limiting their usage are capabilities to perform liver transplantation, resection or tumour ablation, as well as the funding of therapeutic options by the Polish National Health Fund. The international guidelines and studies have established the liver transplantation as a best therapeutic option for HCC in cirrhotic liver. Observation in our study are in accordance with this opinion (21). We have not observed any significant side effects of sorafenib in our studied population. Our results suggested a longer life span of patients with HCC who had received sorafenib. This might suggest revision of indications for wider use of this drug in HCC.

The incidence of HCC in north-eastern Poland is gradually increasing and most frequently affects men aged 50 years and older. AFP is still a useful marker for the diagnosis and monitoring of HCC developed in the cirrhotic liver. It seems beneficial to broaden the indications for the HCC chemotherapy with sorafenib.

Dynamiczny rozwój diagnostyki, technika spektroskopowa polegająca na pomiarze promieniowania rozproszenia Ramana, (nieelastycznego rozpraszania fotonów) umożliwia zidentyfikowanie charakterystycznych, szczytowych metabolicznych spektrów niezbędnych w celu przewidzenia powstania HCC (32). Badania te nie są jeszcze powszechnie dostępne, a być może diagnostyka białek wskaźnikowych procesu nowotworowego lub zastosowanie promieniowania rozproszenia będzie charakterystyczne dla różniących się histopatologicznie HCC.

Okolo 10% HCC rozwija się w niezmiętej marsko tkance wątrobowej. U takich chorych najczęściej stwierdza się zmiany nowotworowe większe w porównaniu do chorych ze zmianami nowotworowymi występującymi w wątrobie o przebudowie marskiej (33). W naszych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w nowotworach występujących u pacjentów z marskością i bez marskości wątroby. Wpływ na to mogła mieć niezbyt duża liczba obserwowanych przez nas pacjentów z HCC bez marskości wątroby.

Rak wątrobowokomórkowy występował najczęściej w wątrobie w segmentach 6, 7 lub 8, najrzadziej w 1 i 3. Przyczyna takiego rozkładu nie jest zrozumiała. Obserwacje te wskazują na konieczność szczególnej uwagi w przypadku zmian ogniskowych występujących w segmentach, w których nowotwór najczęściej występuje.

Ustalone w roku 2016 standardy postępowania terapeutycznego u chorych z rakiem wątrobowokomórkowym w praktyce nie zawsze są możliwe do zrealizowania. Spośród wielu czynników najważniejsze znaczenie mają możliwości wykonania transplantacji, resekcji lub ablacji, jak również stopień finansowania leczenia przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Trudno jest zatem porównywać stosowane terapie. Jednak wyniki badań międzynarodowych i nasze badania wskazują jednoznacznie na największe korzyści w przypadku przeszczepienia wątroby (21).

W naszych badaniach nie zaobserwowano istotnych działań niepożądanych sorafenibu. Ponadto, obserwacje nasze wskazują na dłuższy czas życia chorych z HCC, u których stosowano sorafenib, a to wskazuje na celowość zrewidowania możliwości szerszego zastosowania tego leku.

## PODSUMOWANIE

Częstość występowania HCC w Polsce systematycznie wzrasta i dotyczy najczęściej mężczyzn po 50 roku życia. AFP jest przydatnym markerem w diagnostyce i monitorowaniu leczenia HCC u osób z marskością wątroby. Wydaje się celowe poszerzenie możliwości terapii chorych z HCC sorafenibem.

## REFERENCES

1. Abdel-Rahman O. Hepatocellular carcinoma (HCC); aetiological considerations. *Adv Mod Oncol Res* 2015; 1: 18–19.
2. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010; 16: 2309-24.
3. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46: 48-57.
4. Guerrero RB, Roberts LR. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42: 760-77.
5. Wang HC, Huang W, Lai MD, et al. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 2006;97:683-8.
6. Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P et al. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 2006; 25:3823-33.
7. Kim K, Kim KH, Kim HH et al. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha. *Biochem J* 2008; 416: 219–230.
8. Yang Z, Zhuang L, Lu Y et al. Naturally occurring basal core promoter A1762T/G1764A dual mutations increase the risk of HBV-related hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]
9. Tanabe G, Nuruki K, Baba Y et al. A comparison of hepatocellular carcinoma associated with HBV or HCV infection. *Hepatogastroenterology* 1999; 28: 2442-6.
10. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP 53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 2003; 21:182-91.
11. Arora P, Kim EO, Jung JK et al. Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. *Cancer Lett* 2008; 261:244-52.
12. Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S et al. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 2009; 42:e4355.
13. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M et al. NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol* 2006; 87: 1703-13.
14. Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H et al. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell Signal* 2007; 19: 301-11.
15. Chung YL, Sheu ML, Yen SH. Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 65-73.
16. Bonte D, François C, Castelain S et al. Positive effect of the hepatitis C virus nonstructural 5A protein on viral multiplication. *Arch Virol* 2004; 149:1353-71.
17. Machida K, Cheng KT, Lai CK et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 2006; 80: 7199-207.
18. Longo L, Platini F, Scardino A et al. Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2476-85.
19. McMahon BJ, Bruden D, Townshend-Bulson L et al. Infection With Hepatitis C Virus Genotype 3 Is an Independent Risk Factor for End-Stage Liver Disease, Hepatocellular Carcinoma, and Liver-Related Death. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 3: 431-7.
20. Che L, Pilo MG, Cigliano A et al. Oncogene dependent requirement of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle* 2017 Jan 24 [Epub ahead of print].
21. Trojan J, Zangos S, Schnitzbauer AA. Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments. *Visc Med* 2016; 32: 116-20.
22. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2016; 150: 835-53.
23. Golabi P, Fazel S, Otgonsuren M et al. Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities. *Medicine (Baltimore)* 2017; 9: e5904.
24. Caldwell S, Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:96-101.
25. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 4: 908-43.

26. Stawinska-Witoszynska B, Zysnarska M, Krzywinska-Wiewiorowska M et al. Trends in the Incidence Rates of Chronic Hepatitis B in Poland in the Years 2005 - 2013. *Hepat Mon* 2016; 8: e32692.
27. Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta* 2008; 1-2: 19-26.
28. Sakhuja P, Mishra PK, Rajesh R et al. Clear cell hepatocellular carcinoma: Back to the basics for diagnosis. *J Cancer Res Ther* 2015; 3: 656.
29. Chagas AL, Kikuchi L, Herman P et al. Clinical and pathological evaluation of fibrolamellar hepatocellular carcinoma: a single center study of 21 cases. *Clinics (Sao Paulo)* 2015; 3: 207-13.
30. Liu Z, Ma W, Li H, Li Q. Clinicopathological and prognostic features of primary clear cell carcinoma of the liver. *Hepatol Res* 2008; 3: 291-9.
31. Yamaguchi H, Kuroda K, Sugitani M et al. Transglutaminase 2 is upregulated in primary hepatocellular carcinoma with early recurrence as determined by proteomic profiles. *Int J Oncol* 2017 Mar 20. [Epub ahead of print]
32. Xiao R, Zhang X, Rong Z et al. Non-invasive detection of hepatocellular carcinoma serum metabolic profile through surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nanomedicine* 2016; 8: 2475-84.
33. Hussain SM, Zondervan PE, IJzermans JN et al. Benign versus malignant hepatic nodules: MR imaging findings with pathologic correlation. *Radiographics* 2002; 5: 1023-36; discussion 1037-9.

Received: 23.05.2017

Accepted for publication: 7.08.2017

Otrzymano: 23.05.2017 r.

Zaakceptowano do publikacji: 7.08.2017 r.

**Address for correspondence:**

**Adres do korespondencji:**

Tadeusz Wojciech Łapiński

ul. Żurawia 14,15-540 Białystok tel. 604651709,

e-mail: twlapinski@wp.pl