

Pojava hepatocelularnog karcinoma u pacijenata oboljelih od kroničnog hepatitisa C liječenih direktnodjelujućim antivirusnim lijekovima

Occurrence of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Treated with Direct-Acting Antiviral Therapy

LUCIJA KUNA¹, MARTINA SMOLIĆ^{1,2}, TOMISLAV KIZIVAT^{3,4}, ROBERT SMOLIĆ^{5,6}

¹Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Katedra za farmakologiju i biokemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku; ²Medicinski fakultet Osijek, Katedra za farmakologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku; ³Medicinski fakultet Osijek, Katedra za nuklearnu medicinu i onkologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku; ⁴Klinički bolnički centar Osijek, Klinički zavod za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja; ⁵Medicinski fakultet Osijek, Katedra za patofiziologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku; ⁶Klinički bolnički centar Osijek, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinika za unutarnje bolesti

SAŽETAK _____ Poznato je kako oboljeli od kronične bolesti jetre učestalije obolijevaju od hepatocelularnog karcinoma. Premda se RNA molekula hepatitisa C virusa uspješno eliminira iz cirkulacije direktnodjelujućim antivirusnim lijekovima, HCV RNA može ostati i dalje prisutna u jetrenom tkivu ili perifernim mononuklearnim stanicama te je taj entitet poznat kao okultni HCV. Postoje brojne nedoumice povezane s ponovnom pojavom HCC-a nakon provedenog liječenja DAA terapijom jetrenih stanica kronično zaraženih HCV-om, a jedan od glavnih čimbenika rizika koji dovodi do *de novo* HCC-a je pojava kroničnosti HCV-a u stanicama jetre. Mnoge studije provedene su s ciljem istraživanja promjena jetrenih stanica inficiranih HCV-om u HCC. Međutim, još uvijek nisu u potpunosti jasni molekularni mehanizmi koji vode do progresije kronične HCV infekcije u HCC i učinak HCV-a na promjenu DNA ploidnosti, što dovodi do ponovnog povratka HCC-a nakon liječenja DAA terapijom. Stoga je cilj ovoga članka razmotriti čimbenike rizika koji bi mogli dovesti do razvoja HCC-a nakon liječenja HCV-a upotrebom DAA terapije, poput uloge ciroze jetre, promjene DNA ploidnosti, reaktivacije virusa hepatitisa B, kao i okultne HCV infekcije.

KLJUČNE RIJEČI: hepatitis C virus, hepatocelularni karcinom, direktnodjelujući antivirusni lijekovi

SUMMARY _____ Patients with chronic liver disease are known to be more likely to develop hepatocellular carcinoma (HCC). Although direct-acting antivirals have proven successful in eliminating the hepatitis C virus RNA from blood circulation, the HCV RNA can still remain present in liver tissue or peripheral blood mononuclear cells – a condition known as occult HCV infection. There have been numerous concerns related to the recurrence of HCC after DAA treatment of hepatocytes infected with chronic HCV. One of the major risk factors leading to *de novo* HCC is the chronicity of HCV in liver cells. Moreover, numerous studies investigated the change of HCV-infected hepatocytes into HCC. However, the molecular mechanisms leading to the progression of chronic HCV infection into HCC, as well as the effect of HCV on the alteration of DNA ploidy that leads to recurrence of HCC after DAA treatment, are still unclear. Therefore, this article examines the risk factors that could lead to the development of HCC after treatment of HCV with DAAs, such as the role of liver cirrhosis, reactivation of hepatitis B virus, alteration of DNA ploidy and occult HCV infection.

KEY WORDS: hepatitis C virus, hepatocellular carcinoma, direct-acting antiviral therapy



Uvod

Hepatitis C virus (engl. *hepatitis C virus*, HCV) jedan je od najčešćih uzroka pojave kronične bolesti jetre, a ujedno predstavlja i veliki globalni javnozdravstveni problem (1). Uzrokuje bolest jetre koja posljedično može dovesti do nastanka ciroze i raka jetre (2). Procjenjuje se da je 130 – 150

milijuna ljudi u svijetu zaraženo HCV-om, što pripada u 3 % svjetske populacije. Prisutno je 3 – 4 milijuna novih infekcija godišnje, dok se oko pola milijuna smrti svake godine dogodi zbog komplikacija nastalih uslijed HCV infekcije (8 – 10). Visoka prevalencija infekcije HCV-om procjenjuje se u sjevernoj Africi, Bliskom istoku te Srednjoj i Istočnoj Aziji (> 3,5 %) (3).

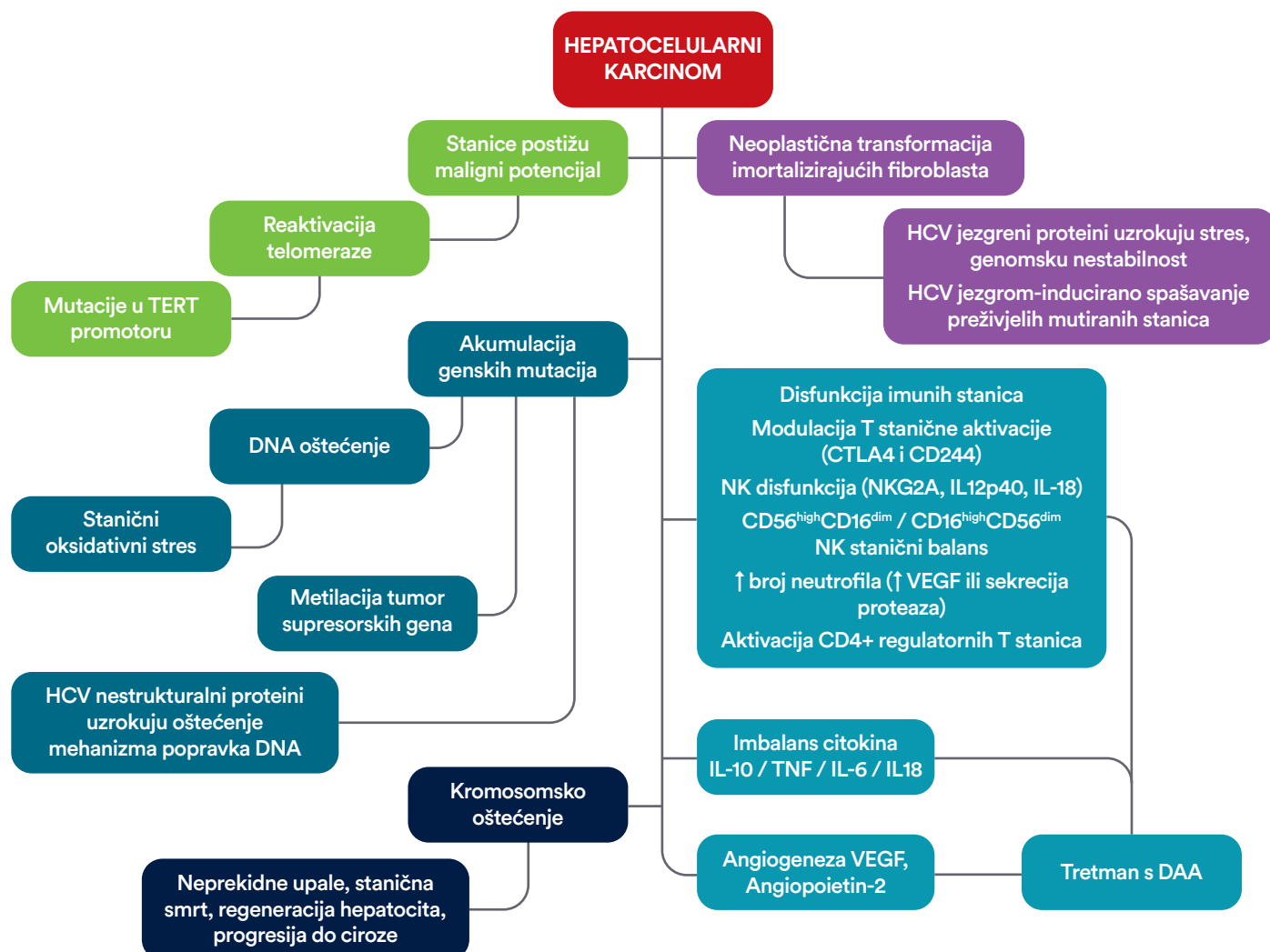
HCV je jednolančani RNA virus, član porodice *Flaviviridae* koji napada hepatocite (4). Premda je razumijevanje molekularne virologije infekcije HCV-om uvelike poboljšano, točni molekularni mehanizmi napredovanja bolesti koji vode do fibroze, ciroze i hepatocelularnog karcinoma jetre (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Brojna klinička i eksperimentalna ispitivanja pokazala su kako je HCV sposoban inducirati hepatokarcinogenezu izravno svojim transkriptima ili proteinima i/ili neizravno induciranjem kronične upale jetre (5). Kod većine oboljelih infekcija se ne može ukloniti, što za posljedicu ima kroničnu HCV infekciju (6). Ciroza povezana s HCV-om povećava rizik za nastanak HCC-a, dok je učestalost pojave HCC-a nakon primjene DAA lijekova značajna (3,3 %), čak i nakon postizanja trajnog virološkog odgovora (engl. *sustained virologic response*, SVR) (7).

Premda virusni klirens kod oboljelih zaraženih HCV-om uzrokuje inhibiciju daljnjih izravnih onkogenih smetnji,

promjena razine fibroze i regenerativni proces nisu značajni. Također, kod oboljelih osoba nastavlja se progresija HCV-a nakon liječenja direktnodjelujućim antivirusnim lijekovima (engl. *direct-acting antiviral therapy*, DAA) (7), a brojne studije su pokazale kako nagli pad virusnog opterećenja postignut uporabom DAA lijekova može inducirati promjene u imunološkim stanicama, neravnotežu citokinske mreže i angiogenezu (8). No rezultati pojedinih studija su kontradiktorni tako da jedinstveni stav o učestalijoj pojavi HCC-a nakon DAA terapije još nije postignut, dok je nedavnom metaanalizom koja je obuhvatila 138 originalnih istraživanja zaključeno kako ne postoje dokazi veće stope HCC-a nakon antivirusnog liječenja DAA-om (9).

Višestupanjski proces hepatokarcinogeneze izazvane HCV-om sastoji se od kombinacije promjena puta koje su uzrokovane ili virusnim faktorima ili djelovanjem imunoloških medijatora kao posljedica kronične upale (Slika 1.) (1, 10).

SLIKA 1. Molekularni mehanizmi potencijalno uključeni u ponovnu pojavu HCC-a nakon antivirusnog liječenja izravnim djelovanjem (DAA) za kroničnu HCV infekciju



HCC je najčešći primarni malignom jetre (11), stoga predstavlja treći najčešći uzrok smrti od malignih bolesti u svijetu (12). Nagli porast HCC-a pripisuje se porastu incidencije infekcije virusom hepatitisa C. Rak jetre smrtonosna je bolest s petogodišnjim postotkom preživljavanja ispod 20 % (13). Nadalje, zemljopisna distribucija HCC-a značajno se mijenja u cijelom svijetu, a stopa incidencije kreće se od 2,1 u Srednjoj Americi do 35,5 u Istočnoj Aziji (3). HCV i hepatitis B (engl. *hepatitis B virus*, HBV) infekcija predstavljaju najčešće uzroke HCC-a. Njihovi se genomi integriraju u DNA domaćina i posljedično tome stvaraju mutacije. Rjeđi uzroci nastanka HCC-a su prekomjerna konzumacija alkohola, kontakt ili konzumiranje toksina *Aspergillus* te brojni metabolički poremećaji (14). Međutim, nedavno su Waziry i suradnici zaključili kako je najbolja strategija smanjenja incidencije HCV-HCC i pojave smrtnosti sprječavanje prenošenja HCV-a zajedno sa sprječavanjem napredovanja bolesti jetre kod pojedinaca zaraženih HCV-om (15).

Mogući čimbenici rizika za razvoj HCC-a

Kronična upala povećava razinu reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS), nakon čega dolazi do oštećenja hepatocita na genetskoj i metaboličkoj razini, što na kraju uzrokuje staničnu smrt. HCV-om izmijenjena okolina pojačava kompenzacijsku regeneraciju jetre koja može pogodovati kromosomskoj nestabilnosti i nepovratnim genetskim promjenama. Bitno je naglasiti kako ove promjene mogu promicati neoplastičnu transformaciju hepatocita i napredovanje malignih klonova (16).

U ovom preglednom radu usredotočit ćemo se na četiri glavna čimbenika rizika odgovorna za progresiju HCC-a i potencijalnu pojavu HCC-a nakon provedene DAA terapije.

Rizik DNA metilacije u progresiji HCC-a

Infekcije HBV-om i HCV-om kod zaraženih miševa s humaniziranom jetrom mogu izazvati vremenski ovisne promjene metilacije deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) (17). U brojnim kliničkim uzorcima HCV-om zaražene jetre pronađeni su metilirani tumor supresorski geni. Metilirani promotori tumor supresorskih gena češće se nalaze u tkivima jetre pozitivne na HCV u usporedbi s tkivima jetre pozitivnim na HBV ili negativnim na hepatitis virus (18), a ujedno su češći u cirozi jetre u odnosu na kronični hepatitis (19). Ova otkrića ukazuju na to da se proces metilacije ubrzava kroničnom HCV infekcijom. Procesi metilacije se mogu razvrstati u tri oblika: oni koji pokazuju značajne razlike između rane pojave HCC-a i nekancerogene jetre, zatim procesi kod kojih je prisutno kontinuirano povećanje progresije tumora te procesi kod kojih se metilacija može detektirati samo u uznapredovanim fazama nastanka tumora. Dakle, prisutna je iznimna različitost u sva tri oblika (20). S obzirom na njihovu kliničku važnost,

brojni metilirani tumor supresorski geni u jetri zaraženoj HCV-om pozitivno su povezani s vremenom nastanka HCC-a (20). Nedavno je Toraih sa suradnicima objavio kako je transkript 1 metastaskog adenokarcinoma pluća (engl. *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*, MALAT1) predskazatelj lošijeg stupnja pri zatajenju jetre u bolesnika s HCV-HCC-om (21) te bi uz primjenu uobičajeno korištenih markera mogao poslužiti kao dobar neinvazivni prognostički biomarker. Također, dokazano je kako se promjene u metilaciji DNA ne mogu pronaći u normalnoj jetri, ali se pronalaze u stanjima koja su prekancerozni uvjeti za nastanak HCC-a poput kroničnog hepatitisa ili ciroze jetre uslijed infekcije HBV-om ili HCV-om (22).

Reaktivacija HBV-a

Iako je HBV DNA virus, posjeduje visoku stopu mutacije zbog svoje replikacijske strategije koju karakterizira stvaranje brojnih različitih dijelova u svakom ciklusu replikacije (23). Postoji sve više dokaza koji ukazuju da integracija virusa hepatitisa B (HBV) i posljedična insercijska mutagenaza imaju značajnu ulogu u staničnom rastu HCC-a. Brojne su studije pokazale kako HCC, koji je induciran infekcijom HBV-a, posjeduje osebujan izgled, karakteriziran povećanom ploidnošću i smanjenjem binokularnosti (16). Međutim, HBV i HCV koji su identificirani kao uzročnici posttransfuzijskog virusnog hepatitisa, evoluiraju u trajne infekcije, što posljedično dovodi do napredovanja kroničnog hepatitisa u cirozu i HCC. Za razliku od ostalih jetrenih virusa, HBV virus je teško u potpunosti iskorijeniti (14).

Unatoč činjenici da cijepljenje može spriječiti infekciju HBV-om, reaktivacija HBV-a nakon imunosupresivne terapije i kemoterapije predstavlja poznatu komplikaciju. Osim toga, reaktivacija HBV-a povezana je s primjenom imunosupresivne terapije inhibitorom tumor nekrozirajućeg faktora alfa (engl. *tumor necrosis factor*, TNF- α), kao i s primjenom rituksimaba, anti-CD20 monoklonskog protutijela u kemoterapiji pacijenata kod kojih je infekcija HBV-om bila prethodno uspješno liječena (14). Nadalje, pokazano je kako je postoperativna reaktivacija HBV-a povezana s imunosupresijom nakon operacije u pacijenata s HBV-om induciranog HCC-a (24). Provjera nutritivnog statusa (engl. *Controlling Nutritional Status*, CONUT) predstavlja učinkovit indeks procjene imunološke i nutritivne funkcije. Međutim, njegova značajnost kao pokazatelja postoperativne reaktivacije HBV-a kod HBV-HCC pacijenata još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Štoviše, reaktivacija HBV-a nakon kurativne operacije uzrok je ponovne reaktivacije HBV-a u bolesnika s malim brojem kopija HBV DNA (25).

Ciroza jetre i promjena DNA

Različiti čimbenici poput dijabetesa, muškog spola i neinvazivnih markera fibroze jetre mogu se upotrijebiti za ot-

krivanje bolesnika s povećanim rizikom za nastanak HCC-a nakon primjene DAA terapije (26). Dijagnosticiranje HCC-a pomoću analize staničnog ciklusa (DNA ploidijske) korisno je u otkrivanju staničnih i strukturnih poremećaja. Primjena modernih tehnika poput protočne citometrije i računalnih tehnika analize slike služe za utvrđivanje promjena u sadržaju DNA te se danas često koriste u dijagnostici i predviđanju nastanka neoplazmi (27, 28). Nekoliko studija je čak pokazalo dobru povezanost između analize sadržaja DNA protočnom citometrijom i računalnom tehnikom temeljenoj na slikama (27, 29, 30). Studije su pokazale da je HCC trenutno glavni uzrok smrti povezan s bolešću jetre kod pacijenata s kompenziranom cirozom. Također, HCV infekcija povezana je s najvećom učestalošću HCC-a, dok gotovo svi slučajevi obolijevanja od HCC-a nastaju u prisutnosti uznapredovane fibroze ili ciroze jetre. Prema tome svaki uzrok bolesti jetre koji može rezultirati uznapredovanom fibrozom ili cirozom treba smatrati potencijalnim čimbenikom rizika za razvoj HCC-a. Promjene u sadržaju DNA koje bi mogle dovesti do progresije bolesti jetre, maligne transformacije jetrenih stanica i razvoja HCC-a pronađene su u HCV pozitivnom jetrenom tkivu (31). Nedavno je dokazano kako HCV posjeduje sposobnost aktiviranja brojnih staničnih odgovora te da bi upravo ti stanični odgovori mogli sudjelovati u patološkom procesu jetrenih bolesti povezanih s HCV-om kroz nekoliko mehanizama kao što su: promjene u metabolizmu lipida, ometanje rasta stanica i/ili stanične proliferacije i stimuliranje onkogenog signalnog puta (32). Međutim, mehanizam nastanka HCC-a uzrokovanog HCV-om ostaje još uvijek nejasan. Kako bismo pobliže pojasnili moguće mehanizme nastanka HCC-a zbog infekcije HCV-om, usredotočili smo se na tri glavne skupine pacijenata.

1.) Pacijenti s kroničnim HCV ili HBV hepatitisom s uznapredovanim bolestima jetre (ciroza, fibroza)

Pokazano je kako kontinuirana upala, stanična smrt, regeneracija hepatocita u sklopu kroničnog hepatitisa te posljedična progresija u cirozu dovode do kromosomskog oštećenja i karcinogeneze jetre (33). Dokazano je i kako se postotak mononuklearnih poliploidnih hepatocita povećava kod pacijenata s izrazitom aktivnošću HBV ili HCV hepatitisa te značajnom fibrozom (34). HCV infekcija povezana je s nastankom HCC-a, ali i s nastankom non-Hodgkinovog limfoma (16, 29). HCV infekcija djeluje kao kofaktor s izrazitom sposobnošću induciranja kroničnog hepatitisa i ciroze, istovremeno održavajući upalu jetre i nekrozu i regeneraciju hepatocita, što naknadno poboljšava višestupanjski proces hepatokarcinogeneze (30). Jaka upala u nekancerogenoj HCV cirotičnoj jetri može ubrzati razvoj HCC-a kod pacijenata zaraženih HCV-om (35). Nedavna istraživanja također su pokazala kako se abnormalna funkcija jetre kod pacijenata s HCV-om može objasniti pojavom onkogeneze u bolesni-

ka s HCV-om odmah nakon razvoja fibroze, zatim ciroze i na kraju HCC-a. To je ujedno i glavni pokazatelj većeg stupnja oštećenja jetre kod pacijenata zaraženih HCV-om (36).

2.) Pacijenti s kroničnim HCV ili HBV hepatitisom bez uznapredovane bolesti jetre (ciroza, fibroza)

Nedavno je Tabll sa suradnicima proveo studiju kojom je ispitaio promjenu ukupnog sadržaja DNA u tkivu jetre različitog histopatološkog stupnja: tkiva jetre zaražena HCV-om, kao i uzorcima tkiva jetre bez prisutnosti HCV-a. Procjena stanične kinetike fibrozne jetre, ciroze i zloćudnog hepatoma u pacijenata zaraženih HCV-om mjerila se protočnom citometrijom (31). Rezultati su pokazali da je 50 % pacijenata bilo pozitivno na HCV RNA u uzorcima seruma, dok je kod 69 % detektirana HCV RNA u jetrenom tkivu (31). Objasnjenije varijacije detektibilne HCV viremije u uzorcima seruma i tkivima nije jasno, ali može biti posljedica aktivnosti imunološkog sustava u perifernoj krvi ili većoj stopi replikacije virusa u hepatocitima u odnosu na onu u perifernoj krvi (37, 38). HCV infekcija potiče proces hepatokarcinogeneze izazivanjem kontinuirane upale, nekroze i regeneracije hepatocita te progresivne ciroze jetre. Provedene studije potvrdile su da HCV pozitivno jetreno tkivo ima povećani sadržaj DNA, uslijed čega dolazi do maligne transformacije jetrenih stanica i nastanka raka. Uzrok takvih rezultata može se objasniti time što HCV inducira snažan stanični oksidativni stres koji posljedično dovodi do oštećenja DNA i nakupljanja genskih mutacija. Štoviše, oštećeni mehanizmi popravljavanja DNA uslijed interakcije s nestrukturnim proteinima HCV-a predloženi su kao vrlo značajan uzrok razvoja HCC-a u kroničnom HCV-u (39 – 41). Mnogobrojne studije ukazuju i na veću učestalost DNA abnormalnosti i promutagenskih lezija u pacijenata s kroničnim HCV-om (42). Stoga je i Tabll sa suradnicima potvrdio kako HCV ima ulogu u napredovanju jetrenih bolesti i HCC-a. Međutim, potrebno je daljnje istraživanje s većim brojem uzoraka jetrenih tkiva, posebno za HCC tkiva negativna na HCV, a isto tako poželjno je mjerenje DNA ploidnosti i proliferacije S faze protočnom citometrijom kako bi se potvrdili rezultati analize DNA image citometrije. Također, rezultati nedavne studije su potvrdili povećane vrijednosti frakcija S-faze kod pacijenata s kroničnim hepatitisom i cirozom jetre (41).

Machida je sa suradnicima dokazao kako HCV infekcija može inhibirati mitotičku kontrolnu točku i tako inducirati poliploidiju te posljedično dovesti do neoplastične transformacije (43). Nekoliko studija izvijestilo je i da HCV sržni proteini mogu izazvati neoplastičnu transformaciju na različite načine, poput indukcije genske nestabilnosti, primarnog stresa ili inducirajući preživljenje mutiranih stanica (44). Međutim, nedavno je Suhail sa suradnicima izvijestio da postoji čvrsta povezanost između polimorfizama pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotid polymorphisms*, SNPs)

srži HCV-a i domaćina, te HCV varijanti unutar NS4 i NS5A domena s patogenezom HCC-a (45). Isto tako, identifikacija gore spomenutih virusnih mutanti i SNP-a domaćina presudna je za procjenu rizika od pojave HCC-a te odgovora na antivirusnu terapiju.

3.) Pacijenti oboljeli od ne-virusnog hepatitisa s uznapredovanom bolešću jetre (ciroza, fibroza)

Ekspresija proteina ciklina A i frakcija S-faze mjerene citometrijom značajno su niže kod kroničnog HCV-a u usporedbi s kroničnim hepatitisom druge etiologije, što predstavlja smanjenu staničnu proliferaciju virusom zaraženih stanica (46). Sadržaj DNA izmjereno je u nekoliko histopatoloških stupnjeva tkiva jetre s pomoću računalne slike, a rezultati su pokazali veći stupanj promjene u DNA ploidnosti (više od G0/G1) 80 % kod oboljelih od hepatocelularnog karcinoma u usporedbi s 40 % kod pacijenata s cirozom, 20 % kod fibrotičnih pacijenata i 4 % u normalnim jetrenim tkivima (više od G0/G1). Budući da su svi bolesnici s HCC-om bili zaraženi HCV-om, rezultati su također pokazali da je u skupini koja je zaražena HCV-om više od 80 % stanica smješteno u tetraploidnoj i aneuploidnoj regiji. To ukazuje na visok stupanj promjene DNA ploidnosti kod HCV pozitivnih pacijenata u usporedbi s HCV negativnim pacijentima koje čini skupina cirotičnih i fibrotičkih jetrenih tkiva bez HCV infekcije. Štoviše, rezultati histokemijske analize potvrdili su rezultate DNA citometrije pokazavši da kancerogena tkiva imaju veći sadržaj DNA u odnosu na cirotična ili fibrotička tkiva sa statističkom značajnošću (p vrijednost $< 0,05$). S druge strane, rezultati histokemijske analize pokazali su i da pozitivna HCV RNA tkiva jetre imaju značajno više sadržaja DNA u usporedbi s negativnim HCV RNA tkivima (p vrijednost $< 0,05$). Ovi su rezultati u skladu s drugim studijama (41). Sadržaj DNA hepatocita u bolesnika s kroničnim hepatitisom C i bolesnika s nevirusnim kroničnim hepatitisom proučavao je Werling sa suradnicima. Pokazali su da pacijenti s kroničnim hepatitisom C posjeduju značajno veći DNA indeks u usporedbi s oboljelima od nevirusnog hepatitisa te zaključili kako je učinak proliferacije HCV-a razlog takvog odstupanja (30).

Okultna HCV infekcija

Okultna HCV infekcija definira se kao prisutnost HCV RNA u hepatocitima ili mononuklearnim stanicama periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) bez detektirajućih razina HCV RNA u serumu. Nedavno su studije pokazale kako je prevalencija okultne HCV infekcije nakon liječenja DAA lijekovima vrlo visoka, stoga je preporučeno dvostruko testiranje razina HCV RNA koje bi se radilo u PBMC-u i u serumu u dvije vremenske točke – na kraju liječenja HCV infekcije DAA-om i tijekom validacije SVR-a nakon postignutog početnog odgovora na liječenje (47). Unatoč

uspješnom uklanjanju virusa DAA lijekovima, brojni pacijenti i dalje pokazuju napredovanje bolesti povezane s HCV-om (48).

Novi DAA lijekovi sposobni su iskorijeniti HCV infekciju kod više od 90 % bolesnika s uznapredovanim bolestima jetre. Unatoč toj činjenici pojava raka jetre se ne smanjuje čak ni kod učinkovito liječenih cirotičnih bolesnika koji su postigli SVR. Usprkos DAA liječenju, visok rizik od ponovne pojave tumora u kratkom vremenskom periodu i dalje je prisutan u bolesnika prethodno liječenih od HCC-a (49). Iako terapija bez interferona (engl. *IFN-free regimens*) učinkovito iskorjenjuje HCV, DAA lijekovi su sposobni eliminirati HCV iz seruma, ali ne i iz stanica hepatocita, odnosno PBMC-a, što za posljedicu ima nastavak replikacija neoplastičnih klonova u uvjetima smanjene upale (50). Dakle, logično je pretpostaviti kako egzogeni IFN, koji je prije korišten kao bitan dio HCV terapije, posjeduje protektivnu ulogu pri razvoju HCC-a aktivirajući upalne stanice s pro-apoptotičkim i antikancerogenim djelovanjem. Stoga je Serti sa suradnicima zaključio kako se prijašnjim liječenjem interferonom alfa (IFN- α) produžuje razdoblje bez nastanka HCC-a te je predložio kako bi nakon iskorjenjivanja HCV-a s DAA lijekovima, uvođenje IFN- α u liječenje moglo „ponovno aktivirati“ imunološki odgovor protiv neoplastičnih klonova, te na taj način spriječiti adjuvantni učinak HCV infekcije na protutumorski imunitet (51). Premda su brojne kliničke studije pokazale da eliminacija virusa hepatitisa C liječenjem uz primjenu IFN- α rezultira suzbijanjem hepatokarcinogeneze, HCC se ipak može razviti nakon eliminacije virusa (52). Naime, petogodišnja incidencija HCC-a nakon postignutog trajnog virološkog odgovora terapijom uz primjenu IFN- α za oboljele od kroničnog HCV-a iznosi 2,3 – 8,8 % (53). Naglasak treba staviti i na starije osobe i one s cirozom jetre koji bi mogli razviti HCC nakon postizanja SVR-a, što bi u sljedećim godinama moglo predstavljati jedno od najvažnijih pitanja HCV-a povezanog s hepatokarcinogenezom (44).

Razvoj HCC-a nakon provedene DAA terapije

Prema najnovijim studijama najveće poboljšanje u liječenju infekcije HCV-om uključuje uvođenje DAA terapije (54). Međutim, bez obzira na izrazit učinak u liječenju HCV-a, i dalje postoji rizik od nastanka HCC-a (54). Drugim riječima, novi DAA lijekovi sposobni su iskorijeniti HCV infekciju kod više od 90 % pacijenata s uznapredovanom bolešću jetre. Nažalost, smanjenje pojave raka jetre ne postiže se kod učinkovito liječenih cirotičnih pacijenata. Pacijenti prethodno liječeni od HCC-a i dalje u kratkom vremenskom periodu imaju visok rizik od ponovnog nastanka tumora (10). No novijim studijama nisu potvrđeni prvotni rezultati o učestalijoj pojavi HCC-a nakon provedene DAA terapije te je nedavnom metaanalizom kojom je uključeno 138 originalnih istraživanja

zaključeno kako nema dokaza o povećanom riziku za razvoj HCC-a nakon provedene DAA terapije (9). Ipak, svi gore navedeni podaci impliciraju da se smanjeni rizik HCC-a nakon iskorjenjivanja HCV-a može postići uporabom IFN terapije, dok kod pacijenata s transplantiranom jetrom takav pristup nije primjenjiv zbog visokog rizika odbacivanja transplantata kao posljedice liječenja IFN-om. Nedavni napredak u genskim analizama, poput sekvenciranja cijelog genoma, imao je značajan učinak na otkriće genetskih i epigenetskih aberacija koje su odgovorne za proces hepatokarcinogeneze povezane s HCV-om. Uz dugotrajnu infekciju HCV-om, akumulacija ovih genetskih i epigenetskih aberacija događa se u jetrenom tkivu, što ukazuje na kronično oštećenje jetre i značajan kancerogeni potencijal, premda je virus hepatitisa već eliminiran ili potisnut (55). Unatoč činjenici da iskorjenjivanje ili suzbijanje virusa hepatitisa može biti dijelom odgovorno za smanjenje incidencije HCC-a, multicentrični tumori se često razvijaju kod pacijenata čak i nakon eliminacije virusa (56).

Nepoznati čimbenici

Etnička skupina, rasa ili zemljopisne regije također su odgovorne za raspodjelu čimbenika rizika u bolesnika s HCC-om. Tako su se oprečni rezultati studija kojima je proučavan rizik za razvoj HCV-a nakon primijenjene DAA terapije pokušali objasniti kao moguća posljedica geografskih i etničkih razlika među proučavanim populacijama, iako su te studije imale i razlike u kriterijima dizajna i uključivanja među studijama (57).

Različiti prevladavajući faktori rizika su: infekcija HBV-om ili HCV-om, alkoholna bolest jetre, nealkoholna masna bolest jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), aflatoksini i slično (24). Većina ovih čimbenika rizika olakšava razvoj i napredovanje ciroze što je najčešće prisutno kod oboljelih od HCC-a (25). Drugi dobro definirani čimbenik rizika za nastanak HCC-a je kontinuirana kronična zlorabota alkohola (40 – 60 g alkohola dnevno) koja također ima snažan utjecaj na promicanje bržeg razvoja ciroze jetre. Također, postoji i velika mogućnost da će osobe zaražene HCV-om, poznate po velikoj uporabi alkohola, razviti HCC u usporedbi s onim osobama koje ne konzumiraju alkohol (17). Općenito, svi čimbenici rizika transformiraju zdravu jetru u HCC putem fibroze i ciroze (24).

Zaključak

HCV ima važnu ulogu u razvoju hepatocelularnog karcinoma. HCV RNA se uspješno eliminira iz cirkulacije krvi direktnodjelujućim antivirusnim lijekovima, premda i dalje može ostati prisutna u jetrenom tkivu i/ili mononuklearnim stanicama periferne krvi (okultna HCV infekcija). Liječnici također trebaju biti svjesni činjenice kako sama uporaba anti-HCV terapije nije sposobna u potpunosti spriječiti hepatokarcinogenezu te bi trebalo obratiti pažnju na različite čimbenike povezane s nastankom hepatokarcinogeneze, poput okultne HCV infekcije, HBV infekcije, ciroze jetre te promjene DNA ploidnosti.

LITERATURA

1. von Köckritz L, Dufour JF. Management of chronic hepatitis C in 2017. *Hamostaseologie* 2017;37:186–95. DOI: 10.5482/HAMO-16-07-0019.
2. Aly AM, Adel A, El-Gendy AO, Essam TM, Aziz RK. Gut microbiome alterations in patients with stage 4 hepatitis C. *Gut Pathog* 2016;8:42. DOI: 10.1186/s13099-016-0124-2.
3. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333–42. DOI: 10.1002/hep.26141.
4. El-Serag HB, Kramer JR, Chen GJ i sur. Effectiveness of AFP and ultrasound tests on hepatocellular carcinoma mortality in HCV-infected patients in the USA. *Gut* 2011;60:992–7. DOI: 10.1136/gut.2010.230508.
5. Bandiera S, Billie Bian C, Hoshida Y, Baumert TF, Zeisel MB. Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Virol* 2016;20:99–105. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.09.010.
6. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol* 2014;61:S14–25. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.06.035.
7. Aziz B, Nazar T, Akhlaq S. The frequency of occurrence of Hepatocellular Carcinoma after direct antiviral therapy in Hepatitis C virus patients. *Pak J Med Sci* 2019;35:101–5. DOI: 10.12669/pjms.35.1.109.
8. Gigi E, Lagopoulos VI, Bekiari E. Hepatocellular carcinoma occurrence in DAA-treated hepatitis C virus patients: Correlated or incidental? A brief review. *World J Hepatol* 2018;10:595–602. DOI: 10.4254/wjh.v10.i9.595.
9. Rutledge SM, Zheng H, Li DK, Chung RT. No evidence for higher rates of hepatocellular carcinoma after direct-acting antiviral treatment: a meta-analysis. *Hepatoma Res* 2019;5. DOI: 10.20517/2394-5079.2019.19.
10. Villani R, Vendemiale G, Serviddio G. Molecular Mechanisms Involved in HCC Recurrence after Direct-Acting Antiviral Therapy.

- Int J Mol Sci 2019;20:49. DOI: 10.3390/ijms20010049.
11. Chonprasertsuk S, Vilaichone RK. Epidemiology and treatment of hepatocellular carcinoma in Thailand. *Jpn J Clin Oncol* 2017;47:294–7. DOI: 10.1093/jjco/hyw197.
 12. Ferlay J, Randi G, Bosetti C i sur. Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int* 2008;101:11–9. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2007.07239.x.
 13. Matsuda F, Torii Y, Enomoto H i sur. Anti-interferon- neutralizing antibody is associated with nonresponse to pegylated interferon- plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012;19:694–703. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2012.01598.x.
 14. Budny A, Kozłowski P, Kamińska M i sur. Epidemiology and risk factors of hepatocellular carcinoma. *Pol Merkur Lekarski* 2017;43:133–9.
 15. Waziry R, Gomaa A, Waked I, Dore GJ. Determinants of survival following hepatocellular carcinoma in Egyptian patients with untreated chronic HCV infection in the pre-DAA era. *Arab J Gastroenterol* 2018;19:26–32. DOI: 10.1016/j.ajg.2018.02.004.
 16. Gramantieri L, Melchiorri C, Chieco P i sur. Alteration of DNA ploidy and cell nuclearity in human hepatocellular carcinoma associated with HBV infection. *J Hepatol* 1996;25:848–53. DOI: 10.1016/S0168-8278(96)80288-1.
 17. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y i sur. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology* 2014;146:562–72. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.056
 18. Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T i sur. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47:908–18. DOI: 10.1002/hep.22110.
 19. Gao DY, Zhang XX, Hou G i sur. Assessment of specific antibodies to F protein in serum samples from Chinese hepatitis C patients treated with interferon plus ribavirin. *J Clin Microbiol* 2008;46:3746–51. DOI: 10.1128/JCM.00612-08.
 20. Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M i sur. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res* 2013;43:339–46. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01073.x.
 21. Toraih EA, Ellawindy A, Fala SY i sur. Oncogenic long noncoding RNA MALAT1 and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2018;102:653–69. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.105.
 22. Kuramoto J, Arai E, Tian Y i sur. Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2017;38:261–70. DOI: 10.1093/carcin/bgx005.
 23. Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. *World J Gastroenterol* 2016;22:145–54. DOI: 10.3748/wjg.v22.i1.145.
 24. Wang XB, Chen J, Xiang BD, Wu FX, Li LQ. High CONUT score predicts poor survival and postoperative HBV reactivation in HBV-related hepatocellular carcinoma patients with low HBV-DNA levels. *Eur J Surg Oncol* 2019;45:782–7. DOI: 10.1016/j.ejso.2018.11.007.
 25. Sohn W, Paik YH, Cho JY i sur. Influence of hepatitis B virus reactivation on the recurrence of HBV-related hepatocellular carcinoma after curative resection in patients with low viral load. *J Viral Hepat* 2015;22:539–50. DOI: 10.1111/jvh.12356.
 26. Degasperi E, D'Ambrosio R, Iavarone M i sur. Factors Associated With Increased Risk of De Novo or Recurrent Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis Treated With Direct-Acting Antivirals for HCV Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019;17:1183–91.e7. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.10.038.
 27. Linder ME, Ewald DA, Miller RJ, Gilman AG. Purification and characterization of Go alpha and three types of Gi alpha after expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1990;265:8243–51.
 28. Suit PF, Bauer TW. DNA quantitation by image cytometry of touch preparations from fresh and frozen tissue. *Am J Clin Pathol* 1990;94:49–53. DOI: 10.1093/ajcp/94.1.49.
 29. Wied GL, Bartels PH, Bibbo M, Dytch HE. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* 1989;20:549–71. DOI: 10.1016/0046-8177(89)90245-1.
 30. Attallah AM, Tabll AA, El-Nashar E i sur. AgNORs count and DNA ploidy in liver biopsies from patients with schistosomal liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem* 2009;42:1616–20. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.07.027.
 31. Tabll AA, Kishta SS, Farrag AR i sur. Alteration of the Total Nuclear DNA Ploidy in Different Histopathological Liver Tissues Negative and Positive for HCV RNA. *Clin Lab* 2015;61:1247–56. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.141249.
 32. Ke PY, Chen SS. Hepatitis C virus and cell ular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses* 2012;4:2251–90. DOI: 10.3390/v4102251.
 33. Gomaa A, Allam N, Elsharkawy A i sur. Hepatitis C infection in Egypt: prevalence, impact and management strategies. *Hepat Med* 2017;9:17–25. DOI: 10.2147/HMER.S113681.
 34. Toyoda H, Bregerie O, Vallet A i sur. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 2005;54:297–302. DOI: 10.1136/gut.2004.043893.
 35. Gehrau RC, Archer KJ, Mas VR, Maluf DG. Molecular profiles of HCV cirrhotic tissues derived in a panel of markers with clinical utility for hepatocellular carcinoma surveillance. *PLoS One* 2012;7:e40275. DOI: 10.1371/journal.pone.0040275.
 36. Saad Y, Awad A, Alakel W, Doss W, Awad T i sur. Data mining of routine laboratory tests can predict liver disease progression in Egyptian diabetic patients with hepatitis C virus (G4) infection: a cohort study of 71806 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2018;30:201–6. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001008.
 37. Das U, Kar P, Gopalkrishna V, Sharma JK, Madan K i sur. Comparative evaluation of hepatitis C virus infection in serum and liver tissue of patients with chronic liver disease by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:256–61. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1999.tb00138.x.
 38. Esaki T, Suzuki N, Yokoyama K i sur. Hepatocellular carcinoma in a patient with liver cirrhosis associated with negative se-

- rum HCV tests but positive liver tissue HCV RNA. *Intern Med* 2004;43:279–82. DOI: 10.2169/internalmedicine.43.279.
39. Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology* 2008;370:295–309. DOI: 10.1016/j.virol.2007.08.037.
 40. Machida K, McNamara G, Cheng KT i sur. Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *J Immunol* 2010;185:6985–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1000618.
 41. Pal S, Polyak SJ, Bano N i sur. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:627–34. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06128.x.
 42. Fujita N, Sugimoto R, Ma N i sur. Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis B and C. *J Viral Hepat* 2008;15:498–507. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2008.00972.x.
 43. Machida K, Liu JC, McNamara G, Levine A, Duan L i sur. Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway. *J Virol* 2009;83:12590–600. DOI: 10.1128/JVI.02643-08.
 44. Smirnova IS, Aksenov ND, Kashuba EV i sur. Hepatitis C virus core protein transforms murine fibroblasts by promoting genomic instability. *Cell Oncol* 2006;28:177–90. DOI: 10.1155/2006/864648
 45. Suhail M, Sohrab SS, Qureshi A i sur. Association of HCV mutated proteins and host SNPs in the development of hepatocellular carcinoma. *Infect Genet Evol* 2018;60:160–72. DOI: 10.1016/j.mee-gid.2018.02.034.
 46. Kim H, Meyer K, Di Bisceglie AM, Ray R. Hepatitis C virus suppresses C9 complement synthesis and impairs membrane attack complex function. *J Virol* 2013;87:5858–67. DOI: 10.1128/JVI.00174-13.
 47. Yousif MM, Elsadek Fakhr A, Morad EA i sur. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved sustained virologic response to direct-acting antiviral agents. *Infez Med* 2018;26:237–43.
 48. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J i sur. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies. *Virus Res* 2018;248:53–62. DOI: 10.1016/j.virus-res.2018.02.016.
 49. Pradat P, Virlogeux V, Trépo E. Epidemiology and Elimination of HCV-Related Liver Disease. *Viruses* 2018;10. DOI: 10.3390/v10100545.
 50. De Mitri MS, Morsica G, Chen CH i sur. Complete eradication of hepatitis C virus after interferon treatment for chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:255–61.
 51. Strazzulla A, Iemmolo RMR, Carbone E i sur. The Risk of Hepatocellular Carcinoma After Directly Acting Antivirals for Hepatitis C Virus Treatment in Liver Transplanted Patients: Is It Real? *Hepat Mon* 2016;16:e41933. DOI: 10.5812/hepatmon.41933.
 52. Zamor PJ, deLemos AS, Russo MW. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: etiology and management. *J Gastrointest Oncol* 2017;8:229–42. DOI: 10.21037/jgo.2017.03.14.
 53. Alexopoulou A, Karayiannis P. Interferon-based combination treatment for chronic hepatitis C in the era of direct acting antivirals. *Ann Gastroenterol* 2015;28:55–65.
 54. Bartosiewicz AJ, Mikuła T. Hepatocellular carcinoma after direct-acting antivirals: an unresolved problem. Review of five cases. *Clin Exp Hepatol* 2019;5:88–92. DOI: 10.5114/ceh.2019.83162.
 55. Niu ZS, Niu XJ, Wang WH. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol* 2016;22:9069–95. DOI: 10.3748/wjg.v22.i41.9069.
 56. Russo FP TM, Imondi A, Lynch EN, Farinati F. HCV clearance by direct antiviral therapy and occurrence/recurrence of hepatocellular carcinoma: still an issue? *Hepatoma Res* 2018;4:25.
 57. Singal AG, Rich NE, Mehta N i sur. Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection Is Associated With Increased Survival in Patients With a History of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2019;156:1683–92. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.01.027.



ADRESA ZA DOPISIVANJE:

izv. prof. dr. sc. Robert Smolić, dr. med.
 Medicinski fakultet Osijek, Katedra za
 patofiziologiju
 Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
 J. Huttlera 4, 31 000 Osijek
 e-mail: robert.smolic@mefos.hr

PRIMLJENO/RECEIVED:

17. 10. 2019./October 17, 2019

PRIHVAĆENO/ACCEPTED:

27. 10. 2019./October 27, 2019

