

Diagnosticul biochimic, imunologic și histologic al tumorilor hepatice maligne primitive

Biochemical, immunological and histological diagnosis of primary liver malignancies

Dr. FLORIN CRISTIAN TAPU, Prof. Dr. ION ROGOVEANU, Dr. COSTIN TEODOR STREBA,
Dr. ALIN GABRIEL IONESCU, Conf. Dr. CRISTIN CONSTANTIN VERE

Clinica de Gastroenterologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Craiova

REZUMAT

Majoritatea formațiunilor hepatice maligne este reprezentată de tumori primitive. Din punct de vedere histologic, originea tumorilor hepatice primitive poate fi foarte variată: hepatocite, colangiocite, structuri mezenchimale sau pot avea compoziție mixtă.

Carcinomul hepatocelular (CHC) ocupă locul cinci ca frecvență printre tumorile maligne. Câțiva markeri serologici sunt folosiți în mod curent pentru diagnosticul și prognosticul CHC; totuși, specificitatea și sensibilitatea lor le fac insuficiente pentru un diagnostic corect. Studiile recente tind să concluzioneze că utilizarea unui grup de markeri este mai adecvată, datorită acurateței combinate mai mari decât a testelor standard singure. Utilizarea markerilor tisulari este restricționată deoarece biopsia hepatică încă reprezintă un risc de diseminare de-a lungul căii parcurse de acul de biopsie, și este în general asociată cu o rată înaltă de rezultate fals-negative, în special la tumorile mici.

Alte tipuri de cancere hepatice, cum ar fi colangiocarcinomul, angiosarcomul, hemangioendoteliomul epitelioid sau hepatoblastomul beneficiază, de asemenea, de markeri serologici, însă diagnosticul pozitiv se face în principal prin metode imagistice.

Cuvinte cheie: tumori hepatice maligne, diagnostic imagistic

ABSTRACT

The majority of liver malignancies are represented by primary tumors of the parenchyma. Their origin may vary based on the histological populations of origin: hepatocytes, cholangiocytes, mesenchymal structures or mixed forms.

Hepatocellular carcinoma (HCC) ranks fifth as frequency among malign tumors. A number of serological markers are currently employed in research for diagnosis and prognosis; however their specificity and sensitivity are insufficient for an accurate diagnosis. Recent studies tend to conclude that a panel of markers is more suitable, as their combined accuracy is higher than standard tests alone. Employment of tissue markers is restricted, as liver biopsy still represents a risk of dissemination along the path of the biopsy needle, and is generally associated with a high rate of false-negative results, especially in small tumors.

Other types of liver cancers, such as cholangiocarcinoma, angiosarcoma, epithelioid hemangioendothelioma or hepatoblastoma also benefit from serological markers, their positive diagnosis being however mainly imagistic.

Key words: liver malignancies, imagistic diagnosis

Adresă de corespondență:

Dr. Costin Teodor Streba, Universitatea de Medicină și Farmacie Craiova, St. Petru Rareș Nr. 2, Craiova
e-mail: costinstreba@gmail.com

Majoritatea formațiunilor hepatice maligne este reprezentată de tumori primitive. Din punct de vedere histologic, originea tumorilor hepatice primitive poate fi foarte variată: hepatocite, colangiocite, structuri mezenchimale sau pot avea compoziție mixtă. (1-4)

Clasificarea tumorilor hepatice maligne (1,5,6)

Tumori epiteliale

Carcinom hepatocelular
Carcinom hepatic fibrolamelar
Colangiocarcinom
Tumori mixte hepato- și colangiocelulare
Hepatoblastom tipul epitelial

Tumori mezenchimale

Angiosarcom
Hemangioendoteliom epitelioid
Sarcom embrionar nediferențiat
Fibrosarcom
Leiomiomasarcom
Rabdomiosarcom embrionar
Histiocitom malign fibros
Limfom hepatic primitiv

Tumori mixte

Hepatoblastom (tipul mixt epitelial-mezenchimal)

Carcinosarcom

Tumori ale celulelor sistemului APUD

Carcinoid hepatic

Carcinomul hepatocelular

Carcinomul hepatocelular (CHC) ocupă locul cinci ca frecvență printre tumorile maligne, cu aproape un milion de cazuri noi anual, iar ca localizare digestivă, reprezintă a doua cauză de cancer după cel gastric. Rata de supraviețuire pentru cancerul simptomatic netratat variază între 0 și 1% la 2 ani. (7-9)

În ceea ce privește mortalitatea, CHC reprezintă a treia cauză de deces prin cancer în lume și principala cauză de deces la cirofici în Europa de Vest. (7,9,10)

Explorări biologice

Explorarea hematologică poate evidenția o anemie ușoară. Anemia este mai frecventă la pacienții chinezi și cei africani de culoare diagnosticăți cu hepatocarcinom, mai mult de jumătate dintre aceștia prezentând anemie. Anemia severă este rară și poate fi determinată de sângerarea tumorii, mai ales când se instalează brusc. Poliglobulia, ca fenomen paraneoplazic, este rară și se datorează substanțelor

eritropoetin-like produse de tumoră. (11,12) Poate fi prezentă o leucocitoză, ușoară sau moderată, cu neutrofilie. (13) Numărul trombocitelor poate fi crescut. (12)

Modificări biochimice

Testele funcționale hepatice nu aduc elemente caracteristice pentru diagnosticul de CHC. Majoritatea pacienților prezintă testele funcționale hepatice modificate din cauza cirozei. De obicei, în stadiile avansate nivelurile serice ale aminotransferazelor, ca și ale fosfatazei alcaline, gama-glutamil transferazei (γ -GT) și lactat de hidrogenazei (LDH) sunt semnificativ crescute. Raportul AST/ALT este supraunitar. Valorile fosfatazei alcaline (FA) sunt mari, pe seama creșterii fracțiunii tumorale specifice acesteia. Izoenzima 5 a LDH are valori mai mari comparativ cu LDH4, spre deosebire de metastazele hepatice, în care creșterea celor două izoenzime este inversată. (14)

Hipoglicemia este prezentă la 30% dintre bolnavi și are mecanism complex:

- consum crescut de glucoză din cauza masei tumorale mari (tumori rapid progresive, nediferențiate);
- glicogenoză dobândită cu creșterea conținutului de glicogen la nivelul țesutului tumoral și scăderea glucozo-6-fosfatazei și fosforilazei (tumori lent progresive);
- nivel ridicat al factorului de creștere insulin-like 2 (IGF 2) la pacienții cu episoade recurente severe de hipoglicemie. (15)

Hiperlipemia apare rar, iar aproximativ o treime din bolnavi au hipercolesterolemie, chiar după o dietă săracă în grăsimi. Prezența hipercolesterolemiei la un pacient cu boală hepatică noncolectatică poate ridica suspiciunea de CHC. În condiții fiziologice, concentrația enzimei HMG-CoA reductază influențează, prin feedback negativ, sinteza colesterolului de către hepatocitele normale. Creșterea sintezei de colesterol la nivelul hepatocitelor maligne se datorează absenței inhibiției exercitate de HMG-CoA reductaza asupra celulelor neoplazice. (16)

Hipercalcemia apare prin producția crescută de parathormon-like (pseudohiperparatiroidism) sau datorită metastazelor osoase. (12)

Sindromul biologic „inflamator” nespecific se caracterizează prin creșterea VSH-ului, α_2 -globulinelor și a fibrinogenului, neavând valoare pentru diagnosticul CHC. Uneori poate fi prezentă o disfibrinogenemie (posibil cu apariția unui tip fetal de fibrinogen), evidențiată prin prelungirea timpului la testul cu reptilază,

reflectând mai degrabă un defect funcțional de întârziere a polimerizării monomerilor de fibrină.

(1) *Criofibrinogenemia* apare rar. (12)

Markeri serologici utilizați în diagnosticul hepatocarcinomului

Markeri tumorali

Potrivit National Cancer Institute (NCI), markerii tumorali sunt substanțe produse de tumoră sau de gazdă, detectabile în fluidele biologice sau țesuturi, care permit diferențierea unei boli neoplazice de una neneoplazică. Acești markeri susțin diagnosticul, au rol în localizarea procesului de neoformare, în aprecierea prognosticului, în monitorizarea evoluției sub tratament, detectarea recidivelor locale sau la distanță și în screeningul populației cu risc.

Există mai multe tipuri de markeri tumorali: enzime, izoenzime, hormoni, antigene oncofetale, epitopi carbohidrați etc. Din nefericire, până în prezent nici unul dintre biomarkerii cunoscuți nu are specificitate satisfăcătoare. (7,17,18)

Prognosticul hepatocarcinomului avansat este sever, în timp ce doar tumorile de dimensiuni reduse, pretabile la tratament curativ, sunt singurele asociate cu o durată de supraviețuire mai lungă. Prin urmare, diagnosticul precoce este singurul care oferă o șansă acestor bolnavi. Acest fapt a determinat căutarea de markeri care să permită detectarea în fază incipientă a carcinomului hepatocelular. (7,17)

Până în prezent nici unul dintre biomarkerii cunoscuți nu are specificitate satisfăcătoare. Cei mai utilizați markeri tumorali serici sunt: alfa-fetoproteina, alfa-fetoproteina fucozilată, des- γ -carboxiprotrombina și α -L-fucozidaza.

Alfa fetoproteina (AFP) este în prezent singurul marker tumoral seric utilizat curent în diagnosticul CHC. α FP este o glicoproteină cu greutate moleculară de 72.000 daltoni, alcătuită din 590 de aminoacizi, glicozilată și sialilată. (1,9,19) Este sintetizată de hepatocite în timpul vieții fetale, iar la adult scade sub 20 ng/ml. La pacienții cu hepatocarcinom este crescută în aproximativ 50-75% dintre cazuri. (9) AFP pare a avea utilitate diagnostică la valori mai mari de 200 UI/ml. Valoarea diagnostică a AFP este limitată de doi factori: CHC cu AFP negativă și existența de rezultate fals pozitive. (1) Determinarea AFP este utilă în următoarele situații: confirmarea CHC în contextul unei leziuni hepatice focale evidențiată imagistic, combinată cu administrarea unei substanțe de contrast; distincția între macronodulii cirofici, nodulii displazici și CHC; screeningul grupelor populaționale

cu risc, în special la pacienții cu ciroză hepatică; depistarea recidivelor după rezecția tumorii. (1,20,21)

Deoarece AFP se asociază cu o sensibilitate scăzută și o specificitate medie, fiind prezent cu predilecție la pacienții cu tumori de mari dimensiuni, unde momentul operator a fost depășit, utilizarea sa este din ce în ce mai mult contestată la nivel mondial. Prin urmare, se impune evidențierea unor noi markeri serologici, capabili să crească acuratețea diagnostică în stadiile precoce ale CHC.

Alfa fetoproteina fucozilată (AFP - L3)

AFP-L3, varianta fucozilată a AFP, are o mare afinitate a lanțului polizaharidic pentru *Lens culinaris* și a fost propusă ca fiind ca un marker mai bun al CHC, având sensibilitate și specificitate crescute față de AFP pentru diagnosticul hepatocarcinomului.

Mai multe studii au urmărit utilizarea AFP-L3 ca factor prognostic în corelare cu mărimea, diferențierea, prezența metastazelor și în general cu evoluția clinică a CHC, însă nu există un consens din acest punct de vedere. Prin urmare, AFP-L3 nu poate fi considerat un marker mai bun decât AFP pentru detectarea hepatocarcinomului celular și deci nu este utilă în studiile de supraveghere/diagnostic. (22-24)

Noi markeri serologici, cum ar fi de exemplu *glypican 3 (GPC3)*, un proteoglican heparan sulfat, par a avea specificitate și sensibilitate mai mari decât AFP (25-27). Studii recente (28,29) au demonstrat că GPC3 prezintă valori crescute chiar și la pacienții la care alți markeri, precum AFP, sunt în limite normale. Această sensibilitate crescută față de AFP se păstrează și la nivelul expresiei din țesutul tumoral. Astfel, se preconizează că GPC3 este un marker, atât serologic cât și tisular, deosebit de util în evaluarea evoluției hepatocarcinomului.

Des-gama-carboxiprotrombina (DCP), protrombină anormală produsă de hepatocitele tumorale care nu prezintă gama-carboxilarea rezidului glutaminic, poate diferenția CHC de formațiuni tumorale hepatice benigne, având o sensibilitate similară cu AFP și o specificitate mai mare în absența deficitului de vitamina K pentru stadiile timpurii ale hepatocarcinomului. (29) Nu există corelații între nivelul seric al AFP și cel al DCP, fiind descrise numeroase cazuri cu AFP negativă, dar pozitive pentru DCP. (30) Determinarea concomitentă a AFP și DCP crește rata diagnostică a CHC. (1) Gamma-glutamyl transferaza poate fi considerată un marker sensibil pentru diagnosticul de certitudine al CHC, dar și pentru diferențiere sau prognostic. (31)

α L-fucozidaza este crescută în CHC datorită unui mecanism necunoscut. Are o sensibilitate de 75% și o specificitate de 90% în diagnosticul CHC. (32) Totuși, acest marker tumoral are o serie de limite. Astfel, într-un studiu efectuat de Di Coccio și colab., α L-fucozidaza nu a putut face distincția dintre ciroza hepatică și CHC. (33)

Transglutaminaza serică 2 a fost citată recent ca un marker serologic și histologic de interes în CHC, determinarea sa cantitativă în combinație cu AFP crescând acuratețea diagnostică și sensibilitatea acesteia din urmă. (34)

Factorul de creștere 2 similar insulinei (IGF-2 – Insulin-like growth factor 2) și interleukina 6 sunt, de asemenea, citați ca markeri ce cresc sensibilitatea AFP în diagnosticul și prognosticul CHC în diferite stadii. (35)

Alți markeri, cum sunt feritina, antigenul carcinoembrionar (CEA), CA-125, fibrinogenul sunt mai puțin sensibili pentru diagnostic. Neurotensina alături de transcobalamină, în special transcobalamina I, cresc în carcinomul fibrolamelar.

Explorări morfologice

Odată cu dezvoltarea tehnicilor imagistice au apărut controversele cu privire la necesitatea confirmării histopatologice de rutină a CHC prin puncție biopsie hepatică (PBH). Principalul risc al PBH este reprezentat de posibilitatea însămânțării pe traiectul acului de biopsie. Alte argumente împotriva efectuării sistematice a PBH sunt: rata crescută de rezultate fals negative în tumorile mici, de sub 1 cm (peste 40%); producerea de hemoragii intratumorale; dificultatea stabilirii diagnosticului în cazul CHC bine diferențiat pe materialul recoltat prin biopsie. (1)

În prezent, un rol extrem de important în diagnosticul CHC revine metodelor imagistice cu substanță de contrast (ultrasonografie, tomografie computerizată spirală multifazică, rezonanță magnetică) care evidențiază masa tumorală cu aspect sugestiv pentru CHC. (9)

Leziunile focale cu diametrul până la 1 cm se supraveghează prin tehnici imagistice (Fig. 1). (36)

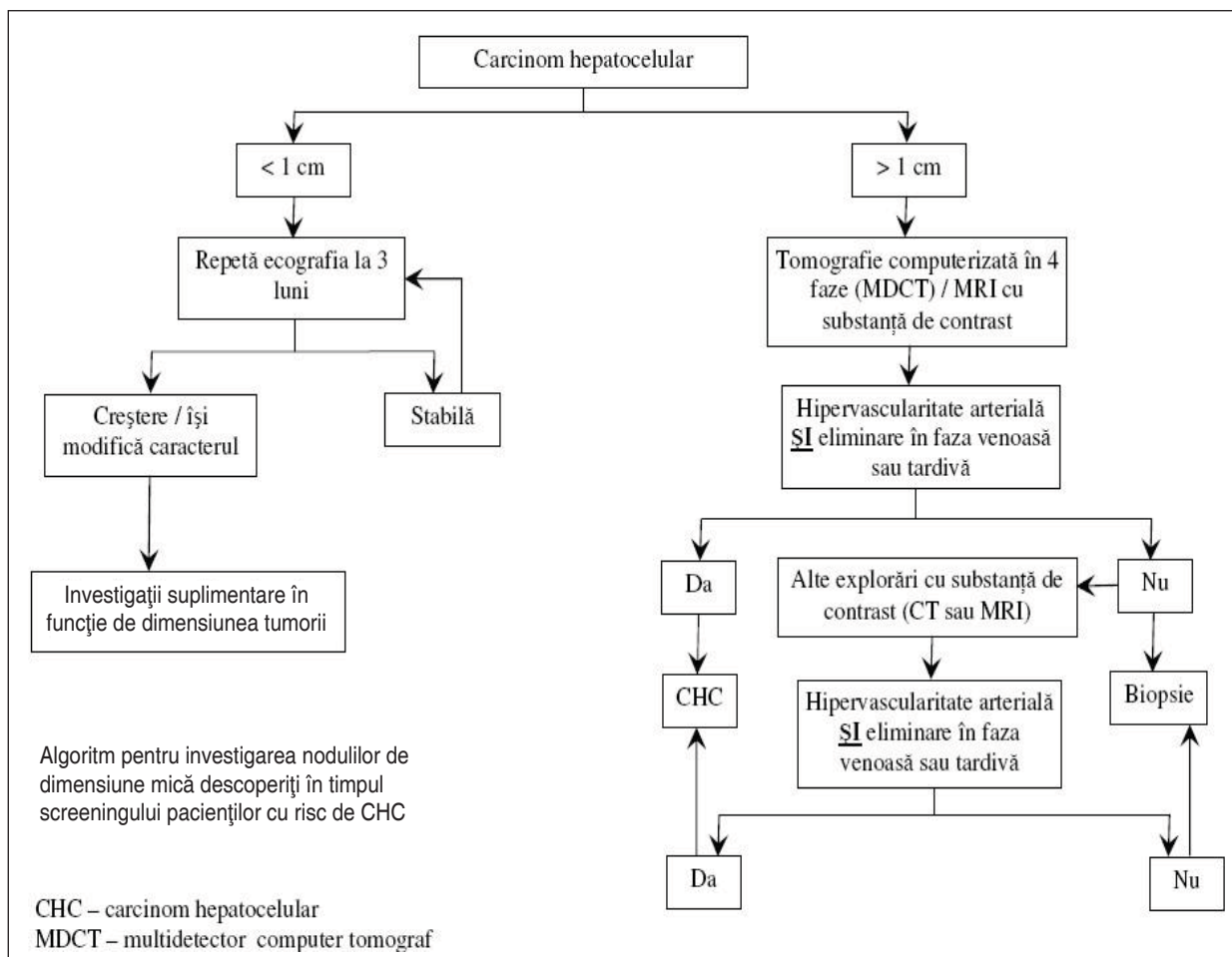


FIGURA 1. Algoritm pentru investigarea nodulilor mici identificați în urma unei ecografii efectuate pentru screeningul pacienților cu risc crescut pentru CHC

În prezent, PBH se recomandă în cazul tumorilor cuprinse între 1-2 cm, la care tehnicile imagistice nu sunt concludente. Pentru stabilirea diagnosticului histopatologic se poate recurge și la explorarea laparoscopică cu efectuare de biopsie hepatică țintită. (36)

OMS recunoaște 5 tipuri de CHC: trabecular (sinusoidal), solid (compact), pseudoglandular (acinar), schiros și fibrolamelar.

Tipul trabecular (sinusoidal) – hepatocitele maligne se dezvoltă în trabecule, de grosimi variabile, diferențiindu-se două forme: micro- și macrotrabeculare. Forma microtrabeculară este mai frecventă și se evidențiază mai ales în nodulii mici. Hepatocitele degenerate malign sunt hipernucleate și hipertrofiate. Straturile celulare sunt periferice și pot fi alcătuite din celule cuboidale sau cilindrice. Celulele maligne sunt orientate spre peretele vascular.

Tipul solid (compact) – este o variantă a tipului trabecular și în special a celui macrotrabecular. Hepatocitele maligne sunt dispuse în plajă, iar sinusoidalele nu mai sunt prezente, fiind înlocuite de capilare răspândite între straturile celulare. Acest tip poate fi confundat cu metastazele scuamoase.

Tipul pseudoglandular (acinar) – reprezintă o varietate de structuri pseudoglandulare. Dezvoltarea acestui tip de CHC se datorează dilatării canaliculelor biliare prezente în trabeculele celulare. Hepatocitele maligne sunt dispuse într-un singur strat de celule cilindrice, care prezintă microvili marginali. Modelul papilar este o variantă rară a tipului pseudoglandular. Tipul acinar de CHC nu se asociază niciodată cu mucina. În spațiile glandulare se observă întotdeauna canalele biliare, cu sau fără bilă.

Tipul schiros – este rar observat, cu excepția cazurilor supuse radio-chimioterapiei sau embolizării arteriale. Nodulii tumorali sunt alcătuiți din celule mici aglomerate, încorporate în țesut conjunctiv, cu pierderea arhitectonicii sinusoidale. Hepatocitele maligne se caracterizează prin eozinofilie abundentă, nuclei mari, nucleoli distincți și prezența secreției biliare. Uneori, hepatocitele maligne se transformă în celule „în spiță de roată”.

Tipul fibrolamelar – este o variantă a CHC care se dezvoltă frecvent la tineri pe ficat necrotic. Tumora este bine delimitată, dar marginile sunt neregulate. Hepatocitele maligne proliferază în cordoane mici, mărginite de collagen hialin lamelar și gros. Frecvent apar calcificări în stroma lamelară. Celulele neoplazice sunt mari, intens eozinofile, cu numeroase incluziuni citoplasmice. Eozinofilia citoplasmei

se datorează acumulării de mitocondrii. Creșterea tumorală este lentă. CHC fibronodular trebuie diferențiat de hiperplazia nodulară focală sau de adenomul hepatic. (14)

Cu excepția CHC fibrolamelar, celelalte tipuri histologice nu au un impact substanțial asupra prognosticului. (37)

Gradarea histologică, cu valoare prognostică, se realizează după Edmonson și Steiner și cuprinde 4 grade, în raport cu gradul de diferențiere al celulelor neoplazice:

Gradul I – se caracterizează în general printr-un aspect benign, natura malignă fiind sugerată de modelul creșterii generalizate.

Gradul II – se caracterizează prin prezența de nuclei mai mari, hiper cromatici și hepatocite dispuse sub formă acinoasă sau prin existența altor anomalii structurale.

Gradul III – pleomorfismul celular devine manifest, cu creșterea raportului nucleocitoplasmatic. Poate dispărea structura trabeculară, iar în interiorul aglomerării celulare pot fi evidențiate numeroase celule gigante sincițiale.

Gradul IV – țesutul carcinomatos este compus în mod uniform din puține celule mature cu nuclei mari și citoplasmă puțină. Structura trabeculară dispăre, ceea ce face dificilă recunoașterea originii hepatocelulare a tumorii.

Acuratețea diagnostică poate fi îmbunătățită prin utilizarea unor markeri tumorali tisulari. La nivel tisular există o multitudine de markeri, împărțiți în mai multe categorii, în funcție de rolul jucat în dinamica tumorală. Un rol important în evoluția oricărei formațiuni maligne, deci și în evoluția hepatocarcinomului, este jucat de angiogeneza, respectiv crearea de vase noi, și invazia și metastazarea tumorii.

Markerii de angiogeneza, care odată pozitivati, indică existența vascularizației de neoformație, sunt extrem de importanți la nivelul CHC, care este o tumoră foarte bine vascularizată, această particularitate stând la baza diagnosticului imagistic bazat pe tehnici cu agenți de contrast, atât în ultrasonografie, cât și în tomografia computerizată sau rezonanță magnetică. Astfel, identificarea unor markeri de neoangiogeneza la nivelul țesutului hepatic poate influența evoluția bolii, densitatea patului vascular fiind un factor de prognostic negativ important.

Densitatea microvascularizației este un index folosit în mod curent, presupunând imunomarcarea unei palete extinse de markeri specifici, prezenți la nivelul peretelui vaselor nou formate, dar exprimați și de restul celulelor tumorale adiacente. Imunomarcarea CD31 și CD34 pare a

avea importanță prognostică mai redusă, conform unor studii recente (38,39), ca și expresia factorului von Willebrand (40), deși au importanță diagnostică, fiind markeri clasici pentru neoangiogeneza. Totuși, se pare că selecția zonelor de interes, cât și a probelor luate în calcul este importantă, de aceea o apreciere corectă a densității microvasculare a întregului parenchim tumoral rămâne utilă.

Alți markeri de neoangiogeneza, cu rol prognostic clar stabilit în literatură, sunt *VEGF (vascular endothelial growth factor – factorul endotelial de creștere vasculară)*, supra-exprimit mai ales în cancerele cu risc mare de (41,42); *factorul inductor al hipoxiei* (43-45); *sintetaza oxidului nitric (NOS)* (46,47); *factorul de creștere al fibroblastelor* (48), ce are rol prognostic doar în cantități mari; *factorul endotelial de creștere ce derivă din trombocite (platelet-derived endothelial growth factor – PD-EGF)*; (49-51); *factorul tisular*; (52,53) *endostatinele/colagenul XVIII*; (54) *interleukina 8* (identificabilă, de asemenea, în serul pacienților cu CHC), și nu în ultimul rând *angiopoietinele*, în special angiopoietinele 1 și 2, al căror raport poate fi folosit cu succes ca factor de prognostic independent pentru supraviețuire. (55,56)

Invazia tumorală, alături de capacitatea tumorii de a metastaza sau de a dezvolta situs-uri satelit în parenchimul hepatic, sunt influențate la rândul lor de o serie de markeri celulari. Determinarea calitativă și cantitativă a acestora are rol prognostic important, supra- sau subexpriarea acestora putând indica încadrarea pacientului într-un alt stadiu tumoral, ce beneficiază de alte măsuri terapeutice. A fost demonstrată, de exemplu, eficacitatea redusă a metodelor de radioablație în cazul tumorilor înalt invazive, situsurile satelite adiacente nefiind tratate în cursul terapiei tumorii primare.

Dintre factorii de proliferare și invazie tumorală, un rol aparte îl joacă *matrix metalloproteinazele (MMP)*, o familie de enzime proteolitice caracterizate prin capacitatea de a degrada matrixul extracelular. *MMP-2 (gelatinaza A)*, o MMP ce degradează colagenul IV, componenta principală a membranei bazale, a fost identificată la pacienții cu recurențe post-rezecție hepatică (57). Expresia concomitentă a MMP-7 și MMP-2 a fost asociată cu recurența post-operatorie în primul an. (58) Expresia *metalloelastazei macrofagelor umane (MMP-12)* se pare că este un factor predictiv pentru o supraviețuire mai bună, în cadrul unei analize multivariate. (59)

Complexele cadherină/catenină sunt implicate în **aderența intercelulară**, pierderea

expresiei *E-cadherinei* fiind în strânsă corelație cu progresia și invazia tumorală. Rolul lor este însă incert, observându-se că dimensiunile inițiale ale tumorii hepatice joacă un rol important în valoarea prag ce ar trebui considerată pentru evaluarea rolului lor prognostic. (60-63)

Alături de acești markeri, se pot cita familii de **factori de creștere** ce au implicații în semnalizarea celulară și intervin în mecanismele de proliferare și extensie a tumorii și a vaselor de neoformație. Astfel, *factorul beta de transformare a creșterii (transforming growth factor beta – TGF-Beta)*, ce aparține unei superfamilii de polipeptide cu rol în semnalizare, intervine în reglarea creșterii celulare, diferențiere, angiogeneza, invazie și funcție imună. (64-66) Familia de *receptori ai factorilor epidermali de creștere (EGFR – epidermal growth factor receptor)* este exprimată în CHC. (67-69) *Receptorul pentru leptină*, hormon circulant secretat de către adipocite, este implicat în modularea creșterii celulare, diferențiere și angiogeneza. (38,70)

Determinarea cu exactitate a valorilor acestor markeri de semnalizare celulară ar putea oferi noi ținte terapeutice importante pentru medicația anticanceroasă, alături de rolul prognostic, care, odată stabilit, ar ușura alegerea metodei terapeutice care să asigure o supraviețuire cât mai îndelungată, cu o rată de recurență tumorală cât mai scăzută.

Colangiocarcinomul

Este o neoplazie cu punct de plecare din epitelul căilor biliare intra- și extrahepatice. Reprezintă a doua tumoră hepatică malignă primitivă ca frecvență după CHC. Aproximativ 20-25% dintre tumori sunt localizate intrahepatic (colangiocarcinom periferic). (71,72)

Explorările biologice sunt în general nespecifice și reflectă în special gradul obstrucției biliare. Se constată creșterea bilirubinei serice, pe seama fracțiunii conjugate, a fosfatazei alcaline și gama glutamil transpeptidazei. Aminotransferazele pot avea niveluri serice ridicate în obstrucția biliară acută sau în colangită. Obstrucția prelungită duce la scăderea valorilor vitaminelor liposolubile și la alungirea timpului de protrombină. Hipercalcemia poate să apară ocazional în absența metastazelor osteolitice. (71,72)

Markeri serologici și biliari utilizați în diagnosticul colangiocarcinomului

Nu există markeri tumorali specifici pentru colangiocarcinom. Cei mai utilizați markeri

tumoral serici sunt CA 19-9, CEA și CA-125, dar au valoare diagnostică limitată. CA 19-9 are valori mari la peste 85% dintre pacienții cu colangiocarcinom, dar poate crește și în icterul prelungit de cauză benignă, precum și în afecțiuni hepatice severe de diverse etiologii. În plus, determinarea CA 19-9 nu poate diferenția colangiocarcinomul de alte cancere în care acest marker tumoral este crescut, cum sunt cancerul pancreatic și cel gastric. (73) CEA este crescut la aproximativ o treime din bolnavii cu colangiocarcinom, însă poate avea valori mari și în bolile inflamatorii intestinale, obstrucția biliară, afectare hepatică severă sau în alte tumori. CA-125 are valori crescute la 40-50% dintre pacienții cu colangiocarcinom. Prezența sa ar putea indica existența metastazelor peritoneale. Valoarea diagnostică a celor trei markeri tumorali menționați crește prin determinarea lor concomitentă. Alți potențiali markeri tumorali pentru diagnosticul colangiocarcinomului sunt CA-195, CA-242, DU-PAN-2, IL-6 și tripsinogenul-2, însă rolul lor nu este pe deplin stabilit. (72-75)

În bilă pot fi identificați markerii tumorali CEA și fibronectina, precum și markeri genetici moleculari (mutații la nivelul genei k-ras, inactivarea genei supresoare p.53 etc.). (76)

Explorări morfologice

Din punct de vedere *macroscopic*, colangiocarcinomul poate fi de două tipuri: periferic sau centrohilar (cu 3 subtipuri: periductal sclerozant, intraductal papilar, infiltrativ nodular). Este ferm, albicios, cu reacție desmoplazică intensă, uneori cu ombilicare centrală, fără hemoragii și necroză.

Confirmarea histologică și citologică a diagnosticului se poate obține prin colangiopancreatografie endoscopică retrogradă, laparoscopie sau laparotomie.

Microscopic, se caracterizează prezența de celule columnare dispuse în tubi, fibroză și mucus. OMS recunoaște următoarele tipuri histologice: tubular/glandular (~90%), trabecular, mucinos, cu celule „în inel cu pecete”, adenoscuamos, mucoepidermoid, sarcomatoid.

Imunohistochemic, se constată că celulele carcinoamelor ductelor biliare pot exprima CEA. Antigenul nuclear de proliferare celulară (PCNA) și ki-67 (proteină nucleară exprimată în concentrație mare în celulele în proliferare și absentă în celulele în repaus) sunt semnificativ crescute în tumorile maligne față de leziunile benigne și semnificativ crescute în tumorile maligne nediferențiate față de cele diferențiate. (74,76)

Expresia oncogenelor c-myc, c-ras și c-erbB-2 poate reprezenta un marker imunohistochemic pentru diferențierea colangiocarcinomului de tumorile benigne. (76)

Deoarece colangiocarcinomul are o evoluție nefavorabilă, s-a urmărit identificarea de noi markeri tisulari care să crească acuratețea diagnostică și să indice prognosticul. În funcție de rolul jucat în dinamica tumorală, acești markeri sunt împărțiți în mai multe categorii.

Angiogeneza, capacitatea de stimulare a formării de noi vase, a fost puțin studiată pentru colangiocarcinom. Park și colab. au arătat că exprimarea la nivel tumoral a *VEGF-C* se corelează cu o durată redusă de supraviețuire postrezecție pentru bolnavii cu colangiocarcinom intrahepatic. (77) În contrast cu studiul menționat, Tang și colab., studiind o serie de markeri ai angiogenezei, *VEGF*, *densitatea microvascularizației*, *angiopoietina-1*, *angiopoietina-2* și *trombospondina-1*, nu au găsit nici o corelație între prezența acestor markeri și supraviețuirea pacienților cu colangiocarcinom. (78)

Invazia tumorală și capacitatea de metastazare pot fi relevate prin utilizarea unor markeri tumorali. Astfel, reducerea expresiei *E-cadherinei* se asociază cu un prognostic negativ, corelându-se cu invazia tumorală și metastazarea. (78)

Reducerea expresiei *syndecan-1 (CD138)*, mediator al aderenței și comunicării intercelulare și între celule și matricea intercelulară, este un factor predictor independent al evoluției nefavorabile în colangiocarcinom. (80)

Expresia *CD24* se asociază cu reducerea supraviețuirii (81,82), supraexprimarea *matrix metalloproteinazei 7* având aceeași semnificație. (83)

Mucinele sunt proteine de dimensiuni mari sintetizate de celulele epiteliale din diverse organe, acționând ca o barieră protectoare la suprafața mucoaselor. Majoritatea studiilor efectuate au evidențiat corelația puternică dintre prezența *MUC1* și capacitatea crescută de invazie și metastazare a colangiocarcinomului. (84-92) În contrast cu *MUC1*, *MUC2* acționează ca o proteină protectoare, exprimarea sa la nivel tumoral indicând un prognostic mai bun. (93) Expresia crescută la nivelul colangiocarcinomului a *MUC4* se corelează cu un prognostic negativ (84, 85), iar bolnavii cu colangiocarcinom, pozitivi pentru *MUC5AC* prezintă un risc crescut de deces. (94)

Angiosarcomul

Este cel mai frecvent tip de sarcom hepatic. Se întâlnește la adulți și predomină la sexul

masculin, având incidență maximă în decadele a șasea și a șaptea de viață. (95-98)

Examenle de laborator relevă modificări nespecifice ale testelor biochimice hepatice. Icterul colestatic este evidențiat frecvent, în special în stadiile tardive. (1, 96-98)

Morfologic, tumorile pot fi unice, dar, de cele mai multe ori, sunt multicentrice. (95,100)

Diagnosticul histopatologic se stabilește prin biopsie țintită, prin laparoscopie, iar tehnicile imunohistochimice evidențiază fenotipul celulelor endoteliale (factorul VIII, CD34, CD31). (1)

Hemangioendoteliomul epitelioid

Este o tumoră cu origine în celulele endoteliale ale vaselor sanguine, la care se asociază o reacție desmoplastică importantă. Predomină la tineri, sub 40 de ani, mai ales la sexul feminin, dezvoltarea sa fiind favorizată de utilizarea de contraceptive orale. (1,101)

Morfologic, tumorile sunt în general multiple, de diverse dimensiuni, localizate în atât în lobul drept hepatic, cât și în cel stâng. Diagnosticul se stabilește prin examen histopatologic. Din punct de vedere celular se identifică tipurile dendritic și intermediar. O caracteristică a celulelor tumorale este prezența de filamente intermediare, care dau aspectul epitelioid. (102) Celulele tumorale sunt alungite, cu citoplasmă vacuolizată. Antigenul factorului VIII este evidențiat frecvent în citoplasmă și în vacuolele intracitoplasmice. Celulele neoplazice de la periferia masei tumorale proliferază de-a lungul sinusoidelor adiacente. (14) Tehnicile imunohistochimice evidențiază natura endotelială a celulelor tumorale, prin imunofluorescența față de anticorpii antifactor VIII, CD34 și CD31. (1)

Hepatoblastomul

Hepatoblastomul este cea mai frecventă tumoră hepatică malignă primitivă la copii. Afecționează în general copiii sub 3 ani, predominând la sexul masculin. Este rar diagnosticat în adolescență și extrem de rar la adulți. (95,103)

Explorările biologice evidențiază adesea anemie și trombocitoză. Transaminazele sunt moderat crescute la 15% din pacienți. (103,104)

AFP are valori foarte mari la 80-90% dintre bolnavi. Deși AFP nu este specifică pentru hepatoblastom, reprezintă un marker important pentru monitorizarea răspunsului la terapie, a progresiei tumorale și în detectia recurenței. Interpretarea rezultatelor poate fi dificilă deoarece hepatoblastomul are frecvență maximă în primii ani de viață, când nivelul AFP este crescut.

DLK (delta-like protein) este o proteină membranară a cărei funcție nu este pe deplin elucidată, a cărei expresie poate fi determinată în diverse țesuturi embrionare, printre care hepatoblastele de rozătoare și țesutul fetal uman. DLK pare să fie un marker foarte sensibil și specific pentru hepatoblastom. (105)

Morfologic, tumora este unică, voluminoasă, bine delimitată și, de regulă, încapsulată. Se localizează mai frecvent în lobul drept și conține adesea arii de necroză și hemoragie. Există două tipuri celulare, cu subtipurile corespunzătoare: tipul epitelial (subtipul fetal, subtipul fetal și embrionar, subtipul macrotrabecular și subtipul cu celule mici și nediferențiate) și tipul cu celule mezenchimale (cu sau fără elemente teratoide). (1,104,106)

BIBLIOGRAFIE

1. **Grigorescu M.** – Tumori hepatice maligne primitive. În *Tratat de Hepatologie*, sub redacția Mircea Grigorescu, Editura Medicală Națională, 2004, 778-812
2. **Imawari M.** – Liver Cancer – Prevention and Early Diagnosis. *JMAJ* 45(3): 130-133, 2002
3. **Alan N., Robotin M., Baker D.** – Epidemiology of primary liver cancer. *CancerForum* Volume 33 Number 2 July 2009.
4. **Bosch F.X., Ribes J., Diaz M., et al.** – Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004 Nov; 127 (5 Suppl 1): S5-S16. (abstract)
5. **Chuang S.C., La Vecchia C., Boffetta P.** – Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV *Cancer Lett.* 2009 Dec 1; 286(1):9-14. Epub 2008 Dec 16. (abstract)
6. **Enjoji M.** – Liver tumors: an overview. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* May 2008
7. **Teofănescu I., Gologan E., Gabriela Ștefănescu G., Bălan Gh.** – Evaluarea SCCA versus AFP în diagnosticul precoce al hepatocarcinomului. *Jurnalul de Chirurgie*, Iași, 2010, Vol. 6, Nr. 3 (ISSN 1584-9341)
8. **Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.** – Estimating the world cancer burden: *Globocan* 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156
9. **Jelic S.** – Carcinomul hepatocelular. Recomandări ESMO pentru diagnostic, tratament și urmărire. *Annals of Oncology* 20 (Supplement 4): iv41-iv45, 2009
10. **El Serag H.B., Mason A.C.** – Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340: 745-750
11. **Kew M.C., Fisher J.W.** – Serum erythropoietin concentrations in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1986; 58:2485
12. **Ciurea T., Săftoiu A.** – Tumorile hepatice. În *Hepatologie clinică*, sub redacția Paulina Ciurea, Tudorel Ciurea, Editura Medicală Universitară Craiova, 2000, 313-344
13. **Kew M.C.** – Hepatic Tumors and Cysts. In *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 7th Edition*, Ed. Saunders, volume II, 2002, 1577-1602
14. **Buligescu L.** – *Tratat de hepatogastroenterologie*, vol. 2, Editura Medicală Amaltea, București, 1999, 663-709

15. Zapf J., Futo E., Martina P. et al. – Can big insulin-like growth factor-II in the serum of a tumor patient account for the development of extrahepatic tumor hypoglycemia? *J Clin Invest* 1990; 90:257
16. Danilewitz M.D., Herrera G., Kew M.C. et al. – Autonomous cholesterol biosynthesis in murine hepatoma: A receptor defect with normal coated pits. *Cancer*. 1984; 54: 1562
17. Fattovich G., Stroffolini T., Zagni I., Donato F. – Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-50
18. M.J. Duffy M.J., McGing P. – Guidelines for the Use of Tumour Markers Third-Edition, April 2005
19. Tatarinov Z.S. – Content of embryospecific alpha-globulin in fetal and neonatal sera and sera from adult humans with primary carcinoma of the liver. *Fed Proc (Trans suppl)* 1966;25:344-346
20. Alpert E. – Human α_1 -fetoprotein. In Okuda K, Peters RL (eds): *Hepatocellular Carcinoma*. New York, Wiley, 1976, 353
21. Kew M.C. – Tumor markers in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1989; 4:373
22. Marrero J., Alok A.S. – Newer markers for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127:S113-119
23. Khien V.V., Mao H.V., Chinh T.T., Ha P.T., Bang M.H., Lac B.V. – Clinical evaluation of lentil lectinreactive alpha-fetoprotein-L3 in histology-proven hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 105-111
24. Yoshida S., Kurokohchi K., Arima K., Masaki T., Hosomi N., Funaki N. – Clinical significance of lens culinaris agglutinin-reactive fraction of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 305-309
25. Zhu Z.W., Friess H., Wang L., Abou-Shady M., Zimmermann A., Lander A.D. – Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001; 48: 558-564
26. Capurro M., Wanless I.R., Sherman M., Deboer G., Shi W., Miyoshi E. – Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
27. Wang H.L., Anatelli F., Zhai Q.J., Brian Adley B., Shang-Tian Chuang S.T., Yang X.J. – Glypican-3 as a Useful Diagnostic Marker That Distinguishes Hepatocellular Carcinoma From Benign Hepatocellular Mass Lesions *Arch Pathol Lab Med* – Vol 132, November 2008, 1723-1728
28. Liu H., Li P., Zhai Y., Qu C.F., Zhang L.J., Tan Y.F., Li N., Ding H.G. – Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010 September 21; 16(35): 4410-4415
29. Zhou L., Liu J., Luo F. – Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12(8):1175-1181
30. Okuda H., Obata H., Nakanishi T. et al. – Production of abnormal prothrombin (des-g-carboxy prothrombin) by hepatocellular carcinoma: a clinical study. *J Hepatol* 1987; 4:347-363
31. Yao D., Jiang D., Huang Z., Lu J., Tao Q., Yu Z., Meng X. – Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 88(4):761-769
32. Deugnier Y., David V., Brissot P. et al. – Serum α -L-fucosidase: A new marker for the diagnosis of primary liver cancer? *Hepatology* 1984; 4:889
33. Di Coccio R.A., Barlow J.J., Motta K.L. – Evaluation of α -L-fucosidase as a marker of primary liver cancer. *IRCS Med Sci* 1985; 23:849
34. Yulin Sun, Wei Mi, Jianqiang Cai, Wantao Ying, Fang Liu, Haizhen Lu, Yuanyuan Qiao, Wei Jia, Xinyu Bi, Ning Lu, Shangmei Liu, Xiaohong Qian, Xiaohang Zhao – Quantitative Proteomic Signature of Liver Cancer Cells: Tissue Transglutaminase 2 Could Be a Novel Protein Candidate of Human Hepatocellular Carcinoma. *J. Proteome Res.*, 2008, 7 (9), pp 3847-3859
35. Porta C., De Amici M., Quaglini S., Paglino C., Tagliani F., Boncimino A., Moratti R., et al. – Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2008; 19(2):353-358
36. Bruix J., Sherman M. – Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Aasld practice guideline*, 2010.
37. Parikh S., Hyman D. – Hepatocellular Cancer: A Guide for the Internist. *The American Journal of Medicine* (2007) 120, 194-202
38. Gheorghe C., Gheorghe L. – Cancerlele digestive: diagnostic, supraveghere și tratament – îndrumar practic, Editura Medicală Celsius, 2005, 90-116
39. Wang S.N., Chuang S.C., Yeh Y.T., et al. – Potential prognostic value of leptin receptor in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2006; 59(12):1267-71
40. Ho J.W., Poon R.T., Sun C.K., Xue W.C., Fan S.T. – Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11(2):176-81
41. El-Assal O.N., Yamanoi A., Soda Y., et al. – Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27(6):1554-62
42. Niu Q., Tang Z.Y., Ma Z.C., Qin L.X., Zhang L.H. – Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker of metastatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000; 6(4):565-8
43. Cui J., Dong B.W., Liang P., Yu X.L., Yu D.J. – Effect of c-myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on prognosis of hepatocellular carcinoma patients undergoing tumor resection. *World J Gastroenterol* 2004; 10(10):1533-6
44. Huang G.W., Yang L.Y., Lu W.Z. – Expression of hypoxia-inducible factor 1a and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol* 2005; 11(11):1705-8
45. Wada H., Nagano H., Yamamoto H., et al. – Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1a. *Liver Int* 2006; 26(4):414-23.
46. Lee J.A., Chu I.S., Heo J., et al. – Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004; 40(3):667-76
47. Ikeguchi M., Ueta T., Yamane Y., Hirooka Y., Kaibara N. – Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8(10):3131-6
48. Rahman M.A., Dhar D.K., Yamaguchi E., et al. – Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in Hepatocellular carcinoma and surrounding liver. *Clin Cancer Res* 2001; 7(5):1325-32
49. Poon R.T., Ng I.O.L., Lau C., et al. – Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001; 182(3):298-304
50. Shimada M., Hasegawa H., Rikimaru T., et al. – The significance of thymidine phosphorylase activity in hepatocellular carcinoma and chronic diseased livers: a special reference to liver fibrosis and multicentric tumour occurrence. *Cancer Lett* 2000; 148(2):165-72
51. Ezaki T., Ikegami T., Ishida T., et al. – Significance of thymidine phosphorylase in HCC with chronic liver disease for longterm postoperative recurrence. *J Surg Oncol* 2003; 83(3):173-9
52. Ezaki T., Ikegami T., Maeda T., et al. – Prognostic value of thymidine phosphorylase activity in liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2005; 10(3):171-6
53. Poon R.T., Lau C.P., Ho J.W., et al. – Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5339-45
54. Kaido T., Oe H., Yoshikawa A., et al. – Tissue factor is a useful prognostic factor of recurrence in hepatocellular carcinoma in 5-year survivors. *Hepatogastroenterology* 2005; 52(65):1393-7
55. Hu T.H., Huang C.C., Wu C.L., et al. – Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005; 18(5):663-72
56. Ren Y., Tsui H.T., Poon R.T., et al. – Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107(1):22-9
57. Ren Y., Poon R.T.P., Tsui H.T., et al. – Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9(16 pt 1):5996-6001
58. Theret N., Musso O., Turlin B., et al. – Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2001; 34(1):82-8
59. Yamamoto H., Itoh F., Adachi Y., et al. – Messenger RNA expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *Jap J Clin Oncol* 1999; 29(2):58-62

60. Gorrin-Rivas M.J., Arie S., Furutani M., et al. – Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance. *Hepatology* 1998; 28(4):986-93
61. Inagawa S., Itabashi M., Adachi S., et al. – Expression and prognostic roles of b-catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8(2):450-6
62. Iso Y., Sawada T., Okada T., Kubota K. – Loss of E-cadherin mRNA and gain of Osteopontin mRNA are useful markers for detecting early recurrence of HCV-related Hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 92(4):304-11
63. Fujito T., Sasaki Y., Iwao K., et al. – Prognostic significance of beta-catenin nuclear expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004; 51(58):921-4
64. Mao T.L., Chu J.S., Jeng Y.M., Lai P.L., Hsu H.C. – Expression of mutant nuclear b-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis. *J Pathol* 2001; 193(1):95-101
65. Okumoto K., Hattori E., Tamura K., et al. – Possible contribution of circulating transforming growth factor- β 1 to immunity and prognosis in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2004; 24(1):21-8
66. Ikeguchi M., Iwamoto A., Taniguchi K., Katano K., Hirooka Y. – The gene expression level of transforming growth factor β (TGF- β) as a biological prognostic marker of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24(3):415-21.
67. Tsai J.F., Jeng J.E., Chuang L.Y., et al. – Elevated urinary transforming growth factor- β 1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1997; 76(2):244-50
68. Daveau M., Scotte M., Francois A., et al. – Hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2003; 36(3):130-41
69. Ito Y., Takeda T., Sakon M., et al. – Expression and clinical significance of the erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 84(10):1377-83
70. Huang T.J., Huang B.J., Liang Q.W., Huang C.W., Fang Y. – Dual fluorescence in situ hybridization in detection of HER-2 oncogene amplification in primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3(1):62-8
71. Wang S.N., Yeh Y.T., Yang S.F., Chai C.Y., Lee K.T. – Potential role of leptin expression in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2006; 59(9):930-4.
72. Anderson C.D., Wright Pinson C., Berlin J., Charia R.S. – Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *The Oncologist* 2004; 9:43-57
73. Boberg K.M., Schrupf E. – Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Current Gastroenterology Reports* 2004; 6:52-59
74. Qin X.L., Wang Z.R., Shi J.S., Lu M., Wang L., He Q.R. – Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: In comparison with CEA. *World J Gastroenterol* 2004; 10(3):427-432
75. Gatto M., Bragazzia M.C., Semeraro R., Napoli C., Gentile R., Torrice A., Gaudio E., Alvaro D. – Cholangiocarcinoma: Update and future perspectives. *Digestive and Liver Disease* 42 (2010) 253-260
76. Khan S.A., Davidson B.R., Goldin R., Pereira S.P., Rosenberg W.M.C., Taylor-Robinson S.D., Thillainayagam A.V., Thomas H.C., Thursz M.R., Wasan H. – Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002; 51(Suppl VI):vi1-vi9.
77. Acalovschi M. – Tumorile biliare benigne. În *Tratat de Hepatologie*, sub redacția Mircea Grigorescu, Editura Medicală Națională, 2004, 893-913
78. Park B.K., Paik Y.H., Park J.Y., et al. – The clinicopathologic significance of the expression of vascular endothelial growth factor-C in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Clin Oncol– Cancer Clin Trials* 2006; 29(2):138-42
79. Tang D., Nagano H., Yamamoto H., et al. – Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance. *Oncol Rep.* 2006; 15(3):525-32
80. Hugo H., Ackland M.L., Blick T., et al. – Epithelial – mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007; 213(2):374-83
81. Harada K., Masuda S., Hirano M., Nakanuma Y. – Reduced expression of syndecan-1 correlates with histologic dedifferentiation, lymph node metastasis, and poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2003; 34(9):857-63
82. Su M.C., Hsu C., Kao H.L., Jeng Y.M. – CD24 expression is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2006; 235(1):34-9
83. Agrawal S., Kuvshnoff B.W., Khoury T., et al. – CD24 expression is an independent prognostic marker in cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2007; 11(4):445-51
84. Miwa S., Miyagawa S., Soeda J., Kawasaki S. – Matrix metalloproteinase-7 expression and biologic aggressiveness of cholangiocellular carcinoma. *Cancer* 2002; 94(2):428-34
85. Shibahara H., Tamada S., Higashi M., et al. – MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. *Hepatology* 2004; 39(1):220-9
86. Tamada S., Shibahara H., Higashi M., et al. – MUC4 is a novel prognostic factor of extrahepatic bile duct carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1):4257-64
87. Higashi M., Yonezawa S., Ho J.J., et al. – Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1999; 30(6):1347-55
88. Matsumura N., Yamamoto M., Aruga A., Takasaki K., Nakano M. – Correlation between expression of MUC1 core protein and outcome after surgery in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* 2002; 94(6):1770-6
89. Suh K.S., Chang S.H., Lee H.J., Roh H.R., Kim S.H., Lee K.U. – Clinical outcomes and apomucin expression of intrahepatic cholangiocarcinoma according to gross morphology. *J Am Coll Surg* 2002; 195(6):782-9
90. Takao S., Uchikura K., Yonezawa S., Shinchi H., Aikou T. – Mucincore protein expression in extrahepatic bile duct carcinoma is associated with metastases to the liver and poor prognosis. *Cancer* 1999; 86(10):1966-75
91. Tamada S., Goto M., Nomoto M., et al. – Expression of MUC1 and MUC2 mucins in extrahepatic bile duct carcinomas: its relationship with tumor progression and prognosis. *Pathol Int* 2002; 52(11):713-23
92. Yuan S.F., Li K.Z., Wang L., et al. – Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11(30):4661-6
93. Boonla C., Sripa B., Thuwajit P., et al. – MUC1 and MUC5AC mucin expression in liver fluke-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11(32):4939-46
94. Higashi M., Yonezawa S., Ho J.J., et al. – Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1999; 30(6):1347-55
95. Boonla C., Wongkham S., Sheehan J.K., et al. – Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* 2003; 98(7):1438-43
96. Anthony P.P. – Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract. In MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ et al. (eds): *Pathology of the Liver*, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994: 635.
97. Tamburo C.H. – Relationship of vinyl chloride to liver cancers: angiosarcoma and hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1984; 4:158
98. Locker G.Y., Duroshaw J.H., Zwelling I.A. et al. – The clinical features of hepatic angiosarcoma: A report of four cases and a review of the literature. *Medicine (Balt)* 1979; 58:48
99. Makk L., Delmore F., Creech J.L. et al. – Clinical and morphological features of hepatic angiosarcoma in vinyl chloride workers. *Cancer* 1976; 37:149
100. Creech J.L., Johnson M.N. – Angiosarcoma of the liver in the manufacture of polyvinyl chloride. *J Occup Med* 16:150, 1974
101. Ishak K.G. – Malignant mesenchymal tumors of the liver. In Okuda K, Ishak KG (eds): *Neoplasms of the liver*. Tokyo, Springer Verlag, 1987, 159
102. Dean P.J., Haggitt R.C., O'Hara C.J. – Malignant epitheloid hemangioendotelium of the liver in young women. Relationship to oral contraceptive use. *Am J Surg Pathol* 1985; 9:695-704
103. Ishak K.G. – Malignant mesenchymal tumors and other nonhepatocellular tumors of the liver. In Okuda K, Tabor E. (eds). *Liver cancer*. New York: Churchill Livingstone 1997:291-314
104. Exelby P.R., Filler R.M., Groshild J.M. – Liver tumors in children with particular reference to hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma. *J Pediatr Surg* 1975; 10:329
105. Stocker J.T., Ishak K.G. – Hepatoblastoma. In Okuda K., Ishak K.G. (eds): *Neoplasms of the liver*. Tokyo, Springer Verlag, 1987, 127-135
106. Dezzo K., Halász J., Bisgaard H.C., Paku S., Turányi E., Schaff Z., Nagy P. – Delta-like protein (DLK) is a novel immunohistochemical marker for human hepatoblastomas. *Virchows Arch.* 2008 Apr; 452(4):443-8. Epub 2008 Jan 31.
107. Craig J/R. – Tumors of the liver. In Zakim D, Boyer TD (eds). *Hepatology – A textbook of liver disease*, 4th ed. Philadelphia: Saunders 2003:1355-1370