

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA HRONIČNIH OŠTEĆENJA JETRE**Zorica Šumarac<sup>1</sup>, Violeta Dopsaj<sup>2</sup><sup>1</sup>Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija i Crna Gora<sup>2</sup>Farmaceutski fakultet, Beograd, Srbija i Crna Gora

*Kratak sadržaj:* Hronične bolesti jetre su oboljenja koja se klinički manifestuju duže od šest meseci. Prema etiološkim činiocima se klasifikuju se kao: infektivna (hronični virusni hepatitis), toksična (alkoholni hepatitis, uticaj lekova i toksina), nasledne metaboličke bolesti, autoimune bolesti i neoplastične bolesti. Patološke promene uključuju: hepatitis B i hepatitis C), autoimuni hepatitis (tip 1, tip 2, tip 3), autoimune holestatske bolesti (primarna bilijarna ciroza-PBC i primarni sklerozirajući holangitis-PSC), hepatitis izazvan lekovima, Wilsonovu bolest, deficit  $\alpha_1$ -antitripsina, primarnu idiopatsku hemohromatozu, kriptogeni hepatitis i nealkoholni steatohepatitis. Za diferencijalnu dijagnozu ovih bolesti neophodno je da inicijalna procena uključi kompletnu istoriju korišćenja lekova, konzumiranja alkohola i određivanje ALT, AST, HBsAg i anti-HCV. Kod osoba sa povećanom katalitičkom aktivnošću ALT a negativnim HBsAg i anti-HCV, neophodno je odrediti autoantitela, Fe, TIBC ili UIBC, ceruloplazmin, i fenotip  $\alpha_1$ -antitripsina. U dijagnozi hroničnog virusnog hepatitisa neophodno je određivanje katalitičke aktivnosti ALT i specifičnih seroloških testova: HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, HBV-DNK, anti-HCV i HCV-RNK. *Alkoholna bolest jetre* se razvija kroz nekoliko faza: od normalne jetre, preko steatoze, alkoholnog hepatitisa do ciroze. Kod pacijenata gde postoji anamnestička potvrda o konzumiranju alkohola neophodno je određivati katalitičku aktivnost  $\gamma$ -GT, AST, ALT, MCV i CDT. Za praćenje efekata terapije treba određivati CDT i  $\gamma$ -GT, a za definitivnu dijagnozu neophodno je uraditi biopsiju jetre. *Ciroza* je terminalni stadijum hroničnog oštećenja jetre a najčešći uzroci su: akutni i virusni hepatitis, dugotrajno i prekomerno konzumiranje alkohola, metaboličke i bilijarne bolesti, autoimuni hepatitis, uticaj lekova, hemikalija i dr. Hronični hepatitis koji progredira u cirozu karakterišu dva osnovna procesa: nekroinflamatorno oštećenje i fibroza. Nekrotičnu inflamaciju karakteriše povećan De Ritisov koeficijent uz značajno povećanu aktivnost  $\gamma$ -GT i LDH. Na smanjenu sintetsku funkciju ukazuju: smanjena aktivnost ChE, snižena koncentracija albumina uz dominaciju serumskih gama-globulina sa visokim koncentracijama IgG i IgA, snižena koncentracija haptoglobina, transferrina, i produženo protrombinsko vreme. Iako se biopsija smatra metodom izbora za dijagnozu ciroze jetre, kao alternativa biopsiji jetre preporučuje se određivanje PGA indeksa ili Fibro test-Acti testa ( $\alpha_2$ -makroglobulin, haptoglobin,  $\gamma$ -GT, ukupni bilirubin, Apo-A I i ALT), koji pokazuju najveću osetljivost, specifičnost kao i najbolju prediktivnu vrednost u dijagnostikovanju ciroze. *HCC* je najčešći oblik *malignog tumora jetre* i može se razviti kao posledica ciroze jetre nastale usled dejstva virusa hepatitisa B i C, nekih toksina, deficita  $\alpha_1$ AT ili hemohromatoze. Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničke slike, primenom UZ, CT, MR dijagnostičkih metoda, biopsijom jetre i na osnovu vrednosti tumorskih markera u prvom redu:  $\alpha$ -fetoproteina, karcinoembrionalnog antigena, i des- $\gamma$ -karboksi protrombina. Promene biohemijskih parametara nisu specifične za tumor, ali mogu poslužiti kod potvrde dijagnoze. Hronično oboljenje slično alkoholnom hepatitisu, praćeno steatozom, parenhimskom inflamacijom i različitim oblicima fibroze, kod pacijenata koji nisu korisnici alkohola, definiše se kao *nealkoholni steatohepatitis* (NASH). Biopsija jetre je nepohodna za potvrdu dijagnoze NASH. U *metaboličke*

---

*Adresa autora:*

Zorica Šumarac

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije

Višegradska 26, 11000 Beograd

Srbija i Crna Gora

e-mail: zsumarac@eunet.yu

*bolesti jetre* ubrajaju se: familijarne hiperbilirubinemije, primarna nasledna hemohromatoza, Wilsonova bolest, deficijencija alfa-1-antitripsina, Reyeov sindrom i dr. Dijagnostičke smernice u diferencijalnoj dijagnozi *familijarnih hiperbilirubinemija* se temelje na određivanju ukupnog i direktnog bilirubina. *Primarna nasledna hemohromatoza* je autosomno, recesivno oboljenje kod koga se gvožđe apsorbira u povećanoj količini i deponuje u parenhimskim organima. Inicijalna procena hemohromatoze vrši se na osnovu utvrđene povećane saturacije transferina (>45%) i nezasićenog kapaciteta vezivanja gvožđa (<28  $\mu\text{mol/L}$ ). Genetska analiza se koristi za postavljanje definitivne dijagnoze. *Wilsonova bolest* je nasledni poremećaj metabolizma bakra karakterističan po deponovanju toksičnih koncentracija bakra u tkivima i organima. Najčešći dijagnostički nalaz je nizak nivo ceruloplazmina u krvi (<0,17 g/L), povišena koncentracija slobodnog bakra u serumu (>7  $\mu\text{mol/L}$ ), smanjena koncentracija ukupnog bakra, povećana ekskrecija bakra urinom (do 20 mmol/24h) i povišena koncentracija bakra u jetrenom tkivu. *Deficit  $\alpha_1\text{AT}$*  je autosomni, recesivni poremećaj sa značajno niskim vrednostima  $\alpha_1$ -antitripsina, koji dovodi do nastanka emfizema pluća, hroničnih oboljenja jetre, ciroze i hepatocelularnog karcinoma. Za postavljanje dijagnoze neophodno je određivanje koncentracije  $\alpha_1\text{AT}$  u serumu, fenotipizacija i genotipizacija. *Reyeov sindrom* je bolest koja se definiše kao akutna, neinflamatorna encefalopatija udružena sa masnom degeneracijom jetre, nepoznate etiologije, praćena opštom mitohondrijalnom disfunkcijom. Diferencijalnom dijagnostikom neophodno je isključiti urođene metaboličke greške, a određivanje aminotransferaza, glukoze, PT, amonijaka i slobodnih masnih kiselina uz biopsiju jetre služi za potvrdu dijagnoze. *U autoimune jetrene bolesti* ubrajaju se: autoimuni hepatitis, primarna bilijarna ciroza i primarni sklerozni holangitis. Diferencijalna dijagnoza uključuje određivanje: anti-nuklearnih At, glatkomišićnih At, At na jetreno-bubrežni-mikrozomalni Ag, At na solubilni-jetreni Ag, anti-mitohondrijalnih At i perinuklearnih anti-neutrofilnih-citoplazmatskih At, kao i primenu endoskopske retrogradne holangiopankreatografije.

*Ključne reči:* hronične bolesti jetre, virusni hepatitis, alkoholni hepatitis, ciroza; NASH, hepatocelularni karcinom, metaboličke bolesti jetre, hemohromatoza, Wilsonova bolest, deficijencija alfa-1-antitripsina, Reyeov sindrom, autoimune bolesti jetre

## Uvod

Jetra je organ koji obavlja niz različitih funkcija u organizmu i ima ključnu ulogu u intermedijernim metaboličkim procesima. Prema Internacionalno prihvaćenoj nomenklaturi oboljenja jetre su klasifikovana kao hepatocelularna (akutni i hronični hepatitis i ciroza), holestatska (npr. opstruktivna oboljenja bilijarnog trakta), neoplastična i infiltrativna. Prema etiologiji dele se na: infektivne, autoimune, toksične, genetski uslovljene i neoplastične bolesti (1). Jetrene bolesti često uključuju i razne manifestacije izvan jetre, reflektujući tako centralnu ulogu jetre u opštem metabolizmu. S obzirom na to da bolesti jetre bez obzira na etiologiju pokazuju sličan tok, to je uloga biohemijskih ispitivanja danas posebno značajna kako u ranom otkrivanju i praćenju bolesti, tako i u diferencijalnoj dijagnozi i razlikovanju akutne od hronične faze bolesti. U *hronične bolesti jetre* mogu se svrstati sledeća oboljenja: hronični hepatitis, ciroza jetre, ascites, alkoholna bolest jetre, jatrogene i profesionalne bolesti, tumori jetre i druge bolesti kao što su holestatske bolesti jetre, malnutricija i nasledne metaboličke bolesti (2). Hronična oštećenja jetre su relativno česta oboljenja praćena hepatičnom nekrozom, inflamacijom i pridruženom fibrozom. Dijagnoza hroničnog oboljenja jetre se postavlja na osnovu kliničke slike, rezultata medicinsko-biohemijskih i seroloških ispitivanja a »zlatnim standardom« se smatra biopsija jetre (3, 4). S druge strane velika je važnost i ostalih dijagnostičkih metoda kao što su: ultrazvuk (UZ), kompjuterizovana tomografija (CT), ezofago-duodenoskopija (EGD) i endoskopska retrogradna holangiopankreatografija (ERCP), koje su korisne za

otkrivanje promena u bilijarnom traktu, fokalnih lezija u jetri i portalne hipertenzije. Laboratorijska dijagnostika je od velikog značaja u otkrivanju bolesti, postavljanju dijagnoze, proceni funkcije jetre, praćenju terapije i proceni prognoze bolesti. Klinička i laboratorijska ispitivanja su često dovoljna za otkrivanje i potvrdu ovih oboljenja.

## Hronični hepatitis

Hronični hepatitis je klinički sindrom heterogene etiologije, tj. grupa bolesti sa nekroinflamatornim procesom u jetri, često praćene fibrozom, i sa trajanjem dužim od šest meseci. Oštećenje može da progredira u cirozu i hepatocelularni karcinom. Etiološki se hronični hepatitis klasifikuje u nekoliko grupa i to kao: *virusni* (hepatitis B i hepatitis C), *autoimuni hepatitis* (tip 1, tip 2, tip 3), *autoimune holestatske bolesti* (primarna bilijarna ciroza-PBC i primarni sklerozirajući holangitis-PSC), *hepatitis izazvan lekovima*, *Wilsonova bolest*, *deficit  $\alpha_1$ -antitripsina*, *primarna idiopatska hemohromatoza*, *kriptogeni hepatitis* i *nealkoholni steatohepatitis* (2, 5).

Bolest se ponekad javlja podmaskom i kod prividno zdrave osobe se može otkriti slučajno. Klinički simptomi nisu uniformni i ne mogu se definisati niti klinički, niti etiološki. Na osnovu morfoloških kriterijuma ovo stanje se klasifikuje kao: *hronični perzistirajući hepatitis* i *hronični aktivni (agresivni) hepatitis*. Hronični perzistirajući hepatitis je najučestaliji oblik hepatitisa i on najčešće predstavlja nastavak akutnog hepatitisa izazvanog virusom hepatitisa B, D ili C, dok

hronični aktivni hepatitis izazivaju hepatitis B virusna infekcija i ostali faktori kao što su alkohol, lekovi i mnogobrojni toksini (6). Faktori rizika za hronični virusni hepatitis prikazani su u *tabeli I*.

*Hronični oblici virusnog hepatitisa* se otkrivaju uglavnom povećanjem aktivnosti aminotransferaza u serumu i pozitivnim serološkim testovima: HBsAg ako se radi o hepatitisu B (HBV), hepatitis C antitela ako se radi o hepatitisu tipa C (HCV) ili HBsAg i hepatitis D antitela u slučaju hepatitisa D (HDV). Glavni serološki markeri koji se koriste za diferencijalnu dijagnozu akutnog i hroničnog hepatitisa B pored HBsAg i anti-HBs su: anti-HBcIgM i IgG antitela, HBeAg, anti-HBe i HBV-DNK (7).

Dijagnozu *akutnog HBV hepatitisa* potvrđuje pozitivan nalaz HBsAg i/ili anti-HBcIgM, uz pozitivan HBeAg i HBV-DNK. Tokom bolesti postoji vremenski period u kojem je HBsAg već nestao iz krvi, a anti-HBs tipa IgG se još nisu pojavila, pa je u tom periodu pozitivan nalaz anti-HBc tipa IgM i IgG jedini pozitivan rezultat (»serološki prozor«) koji potvrđuje dijagnozu. HBcIgM antitela se zadržavaju u cirkulaciji oko 6 meseci, i predstavljaju glavni marker akutne HBV infekcije i »zlatni standard« u postavljanju dijagnoze, a retko se mogu dokazati u slučajevima hroničnog B hepatitisa. Anti-HBcIgG se pojavljuje ubrzo posle anti-HBcIgM i ostaju u toku celog života pacijenta. Hepatitis B može trajati i 3–4 meseca. U oko 10 % slučajeva i nakon akutne faze persistira HbsAg, a HBs anti-

tela se ne pojavljuju, i kod ovakvih pacijenata se razvija hronični hepatitis sa mogućim komplikacijama, cirozom ili progresijom u hepatocelularni karcinom. Oporavak od akutnog hepatitisa se manifestuje gubitkom HBsAg i pojavom HBs antitela. Odsustvo smanjenja HBsAg ukazuje na razvoj statusa povezanog sa razvojem hroničnog hepatitisa B. Prisustvo ukupnog anti-HBc i prisustvo HBsAg u serumu, u periodu dužem od 6 meseci, je potvrda *hronične hepatitisa B* infekcije (3, 8). S obzirom na to da se hronični hepatitis javlja kao hronični replikativni hepatitis ili kao asimptomatski *nereplikativni hepatitis*, potrebna su dalja istraživanja (HBV-DNK i HBeAg) za razdvajanje replikativne od nereplikativne infekcije. U replikativnoj fazi bolesti u serumu se može detektovati HBeAg i HBV-DNK koji su pokazatelji aktivnog umnožavanja virusa i veće verovatnoće za dalju progresiju bolesti. Prelazak iz replikativne u nereplikativni stadijum karakteriše negativan HBeAg i pozitivan anti-HBe. Pojava anti-HBe ima veliki prognostički značaj jer ukazuje na smanjenu infektivnost ili čak potpun izostanak infektivnosti (*Tabela II*).

Infekcija virusom hepatitisa B u terapiji se tretira interferonom i analognim nukleotidima. Laboratorijski testovi imaju veoma značajnu ulogu za procenu koji će pacijent primati antiviralnu terapiju.

Laboratorijski profil kandidata za terapiju je sledeći:

- povišene serumske transaminaze
- prisustvo HBsAg u serumu
- prisustvo HBeAg i/ili HBV-DNK u serumu
- hronični hepatitis potvrđen nalazima biopsije jetre

Laboratorijski nalazi su važni kako u izboru kandidata za terapiju, tako i za praćenje efekata terapije (*Tabela III*).

Dijagnoza *akutne hepatitisa C (HCV) infekcije* se potvrđuje izvođenjem jednog od sledećih testova: anti-HCV test (s obzirom da antitela mogu biti nedetektabilna, test treba ponoviti posle određenog vremena ili uraditi HCV-RNK) i HCV-RNK. Kod 80–85% pacijenata sa akutnim hepatitisom C dolazi do razvoja hroničnog hepatitisa C. Prateći razvoj infekcije prvi marker koji se pojavljuje je HCV-RNK i obično je detektabilan u toku prve ili druge nedelje nakon izlaganja virusu. Koncentracija HCV-RNK ubrzano raste sve do pojave anti-HCV kada počinje da opada (u

Tabela I Faktori rizika za hronični virusni hepatitis

Ustanovljeni faktori rizika	Mogući faktori rizika
<ul style="list-style-type: none"> <li>• I. V. narkomani</li> <li>• Hronična hemodijaliza</li> <li>• Nevakcinisani zdravstveni radnici</li> <li>• Homoseksualci (HBV)</li> <li>• Novorođenčad od HBV ili HCV pozitivnih majki</li> <li>• Transfuzije krvi od davalaca krvi potencijalno HCV pozitivnih</li> <li>• Transfuzija krvi ili transplantacija pre 1992. g. (HCV)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Body piercing</li> <li>• Tetovaže</li> <li>• Često menjanje partnera</li> <li>• Zdravstveni radnici (HCV)</li> <li>• Kontakt sa osobama HBV/HCV pozitivnim</li> </ul>

Tabela II Razlikovanje replikativne od nereplikativne hronične hepatitisa B infekcije

Hronični hepatitis B: razlikovanje replikativnog od nereplikativnog stanja						
	HBsAg	HBV-DNK	HBeAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-Hbe
Replikativno stanje	+	+	+	–	+	–
Nereplikativno stanje	+	–	–	–	+	+

Tabela III Algoritam za praćenje terapije hepatitis B infekcije (7, 8)

Inicijalna procena	Praćenje za vreme terapije	Praćenje nakon terapije
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Serijsko određivanje ALT</li> <li>- Određivanje prisustva: HBsAg, HBeAg, HBV-DNK</li> <li>- Biopsija jetre</li> </ul>	<p><i>Na svake 2-4 nedelje:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- AST, ALT, bilirubin, albumin</li> <li>- Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom</li> </ul> <p><i>Posle 2-4 meseca:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HBsAg, HBeAg, PT, TSH</li> </ul>	<p><i>Na svaka 2-3 meseca:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- AST, ALT, bilirubin, albumin</li> </ul> <p><i>Posle 6 meseci:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HBsAg, HBeAg, PT, TSH</li> </ul>

15% slučajeva HCV-RNK može biti prolazno negativan). Antitela na hepatitis C je moguće detektovati 2-3 meseca nakon izlaganja virusu. Posle akutne faze bolesti, koja je kod većine pacijenata klinički neprimetna, oko 15-20% pacijenata inficiranih hepatitis C virusom se oporavi od infekcije a kod 80-85% pacijenata dolazi do razvoja hronične HCV infekcije.

*Hronična HCV infekcija* prisutna je ukoliko su markeri detektabilni duže od godinu dana. Treba napraviti razliku između pacijenata kod kojih se sumnja na hronični hepatitis i pacijenata koji su se oporavili od infekcije. S obzirom da su HCV antitela pozitivna i kod jednih i kod drugih, neophodno je uraditi HCV-RNK test. Prisustvo HCV-RNK je potvrda hroničnog hepatitisa C, dok je negativan HCV-RNK nalaz potvrda oporavka od infekcije. Kvantitativno utvrđivanje HCV-RNK je dobro i za procenu ishoda interferonske terapije. Antiviralni tretman se preporučuje pacijentima sa hroničnom HCV infekcijom koji imaju povišene vrednosti ALT i inflamaciju potvrđenu biopsijom jetre. Trenutno najuspešnija terapija je kombinacija ribavarina i interferona. Najbolji indikator izlječenja je trajno odsustvo (kvantitativnim dokazivanjem) HCV-RNK, dok pozitivna anti-HCV mogu ostati godinama. Najvažnije komplikacije koje se javljaju u toku primene interferonske terapije jesu: pojava depresije, trombocitopenija i hipotireoidizam; najvažnija komplikacija prilikom primene ribavirina je hemolitička anemija. Evropsko udruženje za ispitivanje hepatitisa preporučuje proveru krvne slike svake nedelje u prvih 4 nedelja tretmana i uobičajena ispitivanja nakon toga. Kod pacijenata sa HCV infekcijom koji su na terapiji interferonom i ribavirinom treba na svakih 6 meseci kvantitativno određivati HCV-RNK, kao i ALT. Takođe se preporučuje određivanje TSH na svakih 6 meseci tretmana (9).

#### *Biohemijski i serološki markeri hroničnog hepatitisa*

Glavni biohemijski marker za otkrivanje i praćenje toka hroničnog oštećenja jetre jeste alanin aminotransferaza (ALT) i njeno povećanje aktivnosti duže od 6 meseci nakon akutne epizode ukazuje na hronični oblik bolesti (10). Aktivnost alanin aminotransferaze često fluktuirira između normalne i povećane, posebno kod virusnog hepatitisa tipa C, gde je utvrđeno da čak

i do 60 % pacijenata povremeno imaju normalnu aktivnost ovoga enzima. Mogućnost kontinuirane normalne aktivnosti ovoga enzima opada sa povećanjem broja određivanja i nakon tri uzastopna nalaza normalnih vrednosti ALT, kod 11 % pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom dolazi do konstantnog povećanja njegove aktivnosti. Kod ovakvih pacijenata biopsijom je potvrđeno da postoji hronično oštećenje jetre ali sa blažim oblikom inflamacije, fibroze i nižom incidencijom od nastanka ciroze u odnosu na pacijente kod kojih postoji konstantno povećana aktivnost ALT. U nekim slučajevima je veoma teško diferencijalno dijagnostikovati akutnu od hronične forme virusnog hepatitisa. Većina pacijenata sa hroničnim hepatitisom C (najčešći oblik hroničnog hepatitisa) ima vrednost ALT 1-4 puta veću od gornje granice referentnih vrednosti, a 90 % pacijenata ima maksimalne vrednosti ALT do 7 puta veće od gornje granice referentnih vrednosti, što je niža vrednost u odnosu na tipične aktivnosti ovog enzima u akutnoj fazi bolesti (7, 9,10). Samo 5 % pacijenata ima maksimalnu aktivnost ovog enzima preko 10 puta veću od normalnih vrednosti, uz pojavu žutice, i u ovakvim slučajevima je dodatnim dijagnostičkim metodama neophodno utvrditi drugi uzrok eventualne pojave akutnog oštećenja. Praćenje populacije na hronični hepatitis nije jeftin postupak te iz tog razloga primenu odgovarajućih dijagnostičkih testova treba ograničiti na visoko rizične individue.

Alanin aminotransferaza ima konstantno višu aktivnost u odnosu na *aspartat aminotransferazu* (AST) u svim slučajevima hroničnog oštećenja jetre izuzev kod alkoholnog. S obzirom da ALT može poticati i iz skeletnih mišića neophodno je anamnestički isključiti uticaj vežbanja i uključiti određivanje kreatin kinaze kao dodatnog markera za diferencijalnu dijagnozu oštećenja skeletnih mišića. Jedan nalaz povišene vrednosti ALT treba potvrditi ponovnim izvođenjem testa pre bilo kakve procene. AST ima normalne ili umereno povišene vrednosti u najvećem broju slučajeva virusnog hroničnog oštećenja sve dok tok bolesti ne pređe u agresivni oblik ili ne progredira u cirozu, kada aktivnost AST postaje značajno viša od aktivnosti ALT. U *hroničnom perzistirajućem hepatitisu* povećan nivo aktivnosti transaminaza se zadržava duži vremenski period. U zavisnosti od veličine hepatocelularnog oštećenja i pojave intrahepatične

opstrukcije kod hroničnog perzistirajućeg hepatitisa *ukupni i direktni bilirubin* kao i *alkalna fosfataza* (ALP) mogu biti normalni ili umereno povećani i nisu značajni kao skrining testovi u dijagnozi ovog oštećenja jetre. Uz ALT i AST može se određivati i  *$\gamma$ -glutamil transferaza ( $\gamma$ -GT)* koja u hroničnim stanjima može biti normalna ili umereno povišena, glutamat dehidrogenaza (GLDH) i *leucin aminopeptidaza* (LAP) koje se uglavnom normalnih aktivnosti, *holinesteraza (ChE)* koja u hroničnim stanjima oštećenja jetre može biti normalna ili umereno snižena u zavisnosti od stepena oštećenja sintetske funkcije jetre, na šta ukazuje i snižena koncentracija serumskog *albumina*. Za procenu sintetske funkcije jetre kao i za procenu težine i prognoze bolesti potrebno je određivati i *protrombinsko vreme* (PT). PT predstavlja važan marker za procenu sintetske funkcije jetre, posebno u hroničnim oštećenjima (smatra se da je PT osetljiviji parametar od određivanja koncentracije albumina u proceni sintetske funkcije jetre). U bolestima jetre PT je često produženo ili zbog neodgovarajuće sinteze faktora koagulacije usled oštećenja hepatocita ili zbog poremećaja protoka žuči što rezultira smanjenom apsorpcijom vitamina K iz creva. Vitamin K je neophodan za posttranslacionu karboksilaciju faktora II, V, VII, X unutar hepatocita i njihovo prevođenje u aktivne oblike. Određivanje PT je korisno i za razlikovanje hronične holestatske bolesti od teških hepatocelularnih oštećenja (4, 7). Ako je PT produženo, potrebno je ponoviti određivanje nakon davanja injekcije vitamina K. Ukoliko se vrednost normalizuje u toku 24–48 sati radi se oolestazi, a u suprotnom slučaju o hepatocelularnoj bolesti. Faktori V i VII se najviše koriste u proceni sintetske funkcije jetre. Smanjena aktivnost F V na 10–20 % koristi se kao marker u prognozi fulminantnog hepatitisa zbog virusne infekcije i odabira bolesnika za transplantaciju. F VII je najvažniji u definisanju odbacivanja transplantata jetre. U blažoj hepatocelularnoj disfunkciji PT je slab pokazatelj oštećenja, ali u akutnom oštećenju jetre PT ima visoku prognostičku vrednost. U akutnom virusnom i hroničnom hepatitisu PT produžen za više od 5 sekundi iznad referentnih vrednosti je rani pokazatelj fulminantnog oštećenja jetre. *Aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (APTT)* odražava koagulaciju unutrašnjeg puta ali zbog veće podložnosti uticaju heparina manje se koristi u dijagnostici jetrenih oštećenja. Niske vrednosti APTT osam dana nakon transplantacije povezane su sa nepovoljnim ishodom. Teška insuficijencija jetre rezultira i smanjenom sintezom uree u jetri i povećanom koncentracijom *amonijaka* u serumu, što vodi nastanku hepatične encefalopatije. Za diferencijalnu dijagnostiku bolesti jetre dobro je uraditi i *elektroforezu serumskih proteina*. Za razliku od opstruktivne žutice kod koje dolazi do povećanja  $\beta$ -globulina, akutnog hepatitisa sa povećanim  $\alpha_2$ -globulinima, kod hroničnih bolesti jetre povećava se koncentracija  $\gamma$ -globulina. Poliklonsko povećanje  $\gamma$ -globulina nalazi se često u hroničnom hepatitisu i cirozi jetre. U retkim slučajevima, pojedinačno određivanje imunoglobulina može pomoći u razlikovanju nekih hroničnih bolesti jetre (npr. u autoimunim bolestima jetre prevladava povećanje IgG; u hroničnoj bolesti jetre čiji je uzrok alkohol prevladava povećanje IgA, a u primarnoj bilijarnoj cirozi povećanje IgM). Kod hroničnog aktivnog (agresivnog) hepatitisa dolazi do akutizacije procesa oštećenja i izmenjenog enzimskog i plazma proteinskog profila. Ovo je težak oblik hepatitisa različite etiologije (HBV, lekovi hemikalije) koji često dovodi do ciroze jetre. Kod hroničnog aktivnog hepatitisa aktivnost aminotransferaza se povećava 10–20 puta, a nekroza ćelija u velikom broju slučajeva dovodi do izraženijeg porasta AST u odnosu na ALT. Povećava se aktivnost  $\gamma$ -GT i GLDH, a bilirubin i ALP ostaju normalni ili povećani u zavisnosti od stepena oštećenja. Sintetska funkcija jetre je izmenjena, tako da su vrednost ChE, faktora koagulacije, holesterola, haptoglobina, transferina i albumina niske. Da bi se pratio razvoj hroničnog hepatitisa neophodno je svaka tri meseca određivati ALT (ukoliko je potrebno i češće s obzirom na mogućnost fluktuacije rezultata ALT) i  $\gamma$ -GT, a u slučaju akutizacije na svakih 6 nedelja. Prema nekim autorima u ovaj dijagnostički protokol treba uvrstiti i određivanje žučnih kiselina i porfirina u urinu pošto je ovo oboljenje često praćeno hroničnom hepatičnom porfirijom. Biopsija jetre je od esencijalnog značaja za definitivnu dijagnozu (10, 11). Na osnovu dostupnih saznanja došlo se do sledećih preporuka:

#### Opšte preporuke

1. Određivanje aktivnosti ALT (najmanja cena koštanja) kod svih metaboličkih, lekovima i alkoholom izazvanih hepatičnih oštećenja.
2. Specifični serološki testovi (HbsAg, anti-HCV), uz određivanje ALT kod pacijenata sa visokim rizikom od virusnog hepatitisa.
3. Testovi na HBeAg i anti-HBe koriste se za praćenje pacijenata koji su hronično HbsAg pozitivni. Kvantitativnu analizu HBV-DNK treba koristiti za praćenje odgovora na antiviralnu terapiju.
4. Ukoliko je anti-HCV pozitivan hroničnu infekciju treba potvrditi kvantitativnim HCV-RNK testom. Ukoliko je nalaz negativan uz povećanu aktivnost ALT, određivanje HCV-RNK treba ponoviti. Kod osoba sa pozitivnim anti-HCV a normalnim ALT takođe treba uraditi HCV-RNK da bi se identifikovali slučajevi sa trajnom infekcijom (jer 15–30 % pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom imaju stalnu ili povremeno normalnu aktivnost ALT, a 15–20 % pacijenata sa pozitivnim anti-HCV nemaju znake viremije) (7).

#### Preporuke za diferencijalnu dijagnozu

1. Inicijalna procena treba da uključuje detaljnu anamnezu korišćenja lekova, konzumiranja alkohola, HbsAg i anti-HCV, kao i određivanje aktivnosti aminotransferaza.
2. Kod osoba sa povećanom aktivnošću ALT, negativnim HbsAg i anti-HCV, neophodno je odrediti antinuklearna antitela, Fe, TIBC ili  $\alpha$ - $\mu$  kao i ceruloplazmin posebno kod osoba mlađih od 40 godina.

3. Kod osoba kod kojih su i ovi markeri kao dijagnostički parametri isključeni određuje se fenotip  $\alpha_1$ -antitripsina. Ukoliko su i ovi testovi negativni ili se ne može doneti medicinski zaključak neophodno je uraditi biopsiju jetre (7).

### Alkoholna bolest jetre

Alkoholna bolest jetre je bolest sa velikom prevalencijom u zapadnom svetu. činioci koji utiču na razvoj bolesti su: genski polimorfizam enzima koji učestvuju u metabolizmu alkohola, razlike u polu, istovremeno prisustvo virusnog hepatitisa, izlaganje toksinima i hepatotoksičnim lekovima (12). Bolest se razvija kroz nekoliko faza: od *normalne jetre*, preko *masne jetre (steatoze)*, *alkoholnog hepatitisa* do *ciroze*. Alkoholni hepatitis je praćen nekrozom hepatocita uz infiltraciju neutrofilima a ciroza je karakteristična po poremećaju strukture hepatocita, fibrozi i stvaranju nodula. Genski polimorfizam enzima koji učestvuju u metabolizmu alkohola (alkohol dehidrogenaza i aldehyd dehidrogenaza) je razlog različitog odgovora organizma na količinu konzumiranog alkohola i njegov uticaj na oštećenje jetre. Tokom metabolizma etanola stvara se veća količina NADH, koji izaziva poremećaj glukoneogeneze i formiranje laktata, ketona, lipida i porfirinogena (13, 14). Ovi procesi dovode do stvaranja depozita masti u ćelijama, hiperlipidemije, ketoze, laktatne acidemije i porfirinurije. Upravo u fazi *steatoze*, povećano se stvaraju masne kiseline, smanjen je transport lipoproteina i pojačano se talože masne kiseline i trigliceridi u hepatocitima. Pored alkohola koji se smatra najznačajnijim uzročnikom ovog poremećaja i drugi faktori izazivaju masnu jetru: gojaznost, diabetes mellitus, lekovi i infektivna oboljenja. Rezultati laboratorijskih ispitivanja mogu biti normalni ili blago promenjeni, ukazujući na blaže oštećenje jetre i njene funkcije. U *alkoholnom hepatitisu* uočavaju se fokalne nekroze sa znacima inflamatorne reakcije. Aktivnost AST je do 10 puta veća od gornje granice referentnih vrednosti i uvek je veća od aktivnosti ALT (odnos AST/ALT >2), što je znak hepatocelularne nekroze i izlaska AST iz oštećenih mitohondrija. Povišena aktivnost mAST kod hroničnih alkoholičara nastaje i usled oštećenja skeletnih mišića (alkoholna miopatija) ili alkoholne kardiomiopatije. Visoko povećanje aktivnosti  $\gamma$ -GT u serumu je najosetljiviji marker alkoholne jetre, delom zbog nekroze jetrenog tkiva, a delom zbog indukcije enzima alkoholom. Ako je aktivnost  $\gamma$ -GT povećana 2–3 puta, a nakon apstinencije od alkohola se vrati u granice referentnih vrednosti, pretpostavlja se da je uzrok direktan uticaj alkohola na sintezu enzima, i radi se o *alkoholizmu bez oštećenja jetre*. Ukoliko se  $\gamma$ -GT koji je povećan 8–10 puta, nakon apstinencije alkoholom ne vraća na normalne vrednosti i ostaje povećan 6–8 nedelja, rezultat ukazuje na oštećenje jetre ne-alkoholne etiologije. Koncentracija bilirubina i ALP su obično umereno povećani, izuzev u slučaju

holestaze kada koncentracija bilirubina može dostići vrednost i do 500  $\mu$ mol/L. U zavisnosti od obima neroze smanjena je aktivnost ChE, produženo je PT, smanjena koncentracija albumina, a povećana koncentracija globulina u serumu, uz izrazitije povećanje koncentracije IgA. Koncentracija ukupnog bilirubina veća od 400  $\mu$ mol/L, albumina manja od 25 g/L i PT produženo preko 20 sekundi od gornje granice ukazuju na veliku verovatnoću od smrtnog ishoda bolesti. S obzirom da je jetra glavno mesto u organizmu gde se sintetišu lipoproteini i odigrava njihov metabolizam, u slučaju hepatocelularnog oštećenja snižava se nivo hepatičnih enzima: lecitin-holesterol acil transferaze (LCAT) i hepatične triglicerid lipaze. U plazmi je povećan nivo triglicerida i dolazi do akumulacije lipoproteina veoma niske gustine (VLDL) kao i HDL-holesterola, a smanjen je procenat holesterol estara. Elektroforetski profil lipoproteina pokazuje široku, intenzivnu  $\beta$ -traku (tip IV hiperlipoproteinemije). Kao posledica razvoja fibroze može doći do zastoja u cirkulaciji i nastanka portalne hipertenzije. Kod ovih bolesnika se može razviti i hepato-renalni sindrom, što dovodi do povećane koncentracije uree i kreatinina u serumu. Kao najspecifičniji biohemijski marker u dijagnostici promena izazvanih uticajem alkohola je *ugljenohidratom-deficijentni transferin (asijalo- i disijalo-transferin, CDT)*, koji se koristi kao rani marker poremećaja jetrene funkcije (15, 16). Smatra se da se on povećano produkuje pod uticajem alkohola, s obzirom da etanol direktno deluje na povećanje aktivnosti sialidaze i smanjenje aktivnosti glikoprotein glikoziltransferaze, što omogućava proces desijalinizacije molekula transferina i nastanka CDT. Njegova dijagnostička specifičnost je veća u odnosu na  $\gamma$ -GT, a nedostatak određivanja je niska osetljivost, skup postupak određivanja i nedovoljno standardizovane metode određivanja (17). Dijagnostička osetljivost povećava se paralelnim određivanjem oba navedena markera hroničnog alkoholizma. Određivanje CDT je od velikog značaja za praćenje hroničnog uzimanja alkohola, kao i praćenja toka lečenja s obzirom da mu je poluvreme života 15 dana. Uz CDT i  $\gamma$ -GT radi povećanja predikcije neophodno je istovremeno određivati i MCV s obzirom da ovi pacijenti usled nedostatka folne kiseline i vit. B<sub>12</sub> pokazuju i znake izražene makrocitne anemije (MCV > 100) (18). Prisutna je leukocitoza (leukociti do  $40 \times 10^9/L$ ), i trombocitopenija kao posledica poremećene funkcije usled dejstva alkohola i portalne hipertenzije sa hipersplenizmom. Kao korisni markeri mogu se koristiti hemoglobin-acetaldehydna jedinjenja, aktivnost eritrocitne aldehyd-dehidrogenaze i beta-heksozaminidaze. Iako je određivanje koncentracije alkohola (unutar 4 do 6 sati) specifično, zbog kratkog poluvivota etanola onemogućena je procena prethodnog unosa alkohola, te se ovaj test retko koristi. Kod 20% hroničnih alkoholičara razvija se ciroza jetre. Ukoliko klinički pregled i laboratorijska dijagnostika ukazuju na alkoholni hepatitis, steatozu jetre ili cirozu, konačna dijagnoza se

može postaviti samo mikroskopskim pregledom uzorka tkiva dobijenog biopsijom jetre. Niže se navode prihvaćene preporuke.

### Preporuke

Kod pacijenata gde postoji anamnestička potvrda o konzumiranju alkohola:

1. Određivati  $\gamma$ -GT, MCV, i CDT kao i aktivnost AST i ALT (AST/ALT) i elektroforezu proteina.
2. U toku praćenja efekata terapije određivati CDT i  $\gamma$ -GT.
3. Biopsija jetre (7, 18).

### Ciroza jetre

Prema definiciji SZO ciroza jetre je difuzni proces koji se karakteriše fibrozom tkiva i konverzijom tkiva jetre u strukturalno abnormalne nodule koje nemaju normalnu lobularnu organizaciju. Histološki se uočava hepatocelularna nekroza, nodularna regeneracija jetrenog parenhima i stvaranje fibroznih traka koje smanjuju masu funkcionalnih hepatocita i cirkulaciju. Klinička slika ciroze pokazuje opšte znake insuficijencije jetre, ascit, edem, splenomegaliju (zbog portne hipertenzije), peptički ulkus (zbog staze krvi i poremećaja u epitalizaciji), vaskularne angiome i eriteme. Ciroza je terminalni stadijum hroničnog oštećenja jetre izazvan upalnim procesima u jetri i metaboličkim bolestima jetre (6, 19). Najčešći uzroci ciroze jetre su akutni i virusni hepatitis, dugotrajno prekomerno konzumiranje alkohola, metaboličke i bilijarne bolesti, autoimuni hepatitis, uticaj lekova, hemikalija i ostali uzroci.

Hronični hepatitis koji progredira u cirozu karakteriše dva osnovna procesa: *nekro-inflamatorno oštećenje* i *fibroza*. Dok obim inflamacije odražava stepen oštećenja jetre, stepen fibroze korelira sa nastankom ciroze. Tokom procesa *fibroze* proizvode se proteini: kolagen, laminin, elastin i fibronektin, koji se deponuju u samoj jetri, kao i različiti proteoglikani od kojih je najvažniji hijaluronat (20, 21). Nivo proteina plazme sintetisanih tokom procesa fibroze, proteoglikani i njihovi prekursori mogu služiti kao značajni markeri koji ukazuju na stepen razvoja fibroze. Marker ekstraselularnog metabolizma koji se određuju u cilju diferencijalne dijagnoze i razlikovanja hroničnih bolesti jetre sa uznapredovalim fibroznim procesom od onih bez razvijene fibroze su: 7S fragment tip kolagena IV (C IV), amino terminalni propeptid tip III prokolagena (PIIIP), transformišući faktor rasta (TGF- $\beta_1$ ), i hijaluronska kiselina (HA). Određivanje hijaluronske kiseline ima veliki značaj kao screening test za procenu stepena ciroze i smatra se jednim od najosetljivijih parametara za praćenje i razlikovanje ovih oboljenja. Istovremeno u hroničnom hepatitisu dolazi do sinteze i metaloproteinaza, enzima odgovornih za razgradnju izmenjenog tkiva nastalog pod uticajem fibroze. Markeri fibrolize su: matriks metaloproteinaze

(MMP-1, MMP-2, MMP-9), kao i njihovi tkivni inhibitori TIMP-1 i TIMP-2 (22). Kombinacijom markera koji reflektuju fibrogenezu i fibrolizu moguće je pratiti proces fibroze i njegovu progresiju. Jedan od najznačajnijih biohemijskih markera čiji porast koncentracije karakteriše proces fibroze i istovremene nekrotične inflamacije je  $\alpha_2$ -makroglobulin. S obzirom da pripada grupi inhibitora proteinaza, njegova povećana sinteza može dovesti do inhibicije katabolizma ekstraselularnih-matriks proteina, i na taj način  $\alpha_2$ -makroglobulin može menjati proces fibroze jetrenog tkiva (23). Drugi plazma protein koji pripada grupi  $\alpha_2$ -globulina je *haptoglobin* i smatra se da njegova smanjena koncentracija tokom procesa fibroze nije posledica hemolize niti hipersplenizma, već insuficijencije hepatocita, što prevazilazi njegovo povećanje kao reaktanta akutne faze tokom procesa inflamacije. Istovremena suprotna korelacija  $\alpha_2$ -makroglobulina i haptoglobina sa procesom fibroze se može objasniti efektom koji izaziva hepatocit rastući faktor (HGF) koji svojom povećanom sintezom pod uticajem transdukcije gena za HGF redukuje sintezu TGF- $\beta_1$  i haptoglobina a povećava sintezu  $\alpha_2$ -makroglobulina (24, 25).

Tokom razvoja hroničnog hepatitisa do ciroze, *nekrotičnu inflamaciju* karakteriše De Ritisov koeficijent  $>1$  uz značajno povećanu aktivnost  $\gamma$ -GT i LDH (izoenzim LDH<sub>5</sub>). U alkoholnoj cirozi je najviše izražen porast aktivnosti  $\gamma$ -GT (do 1000 U/L). Povećanje aktivnosti celularnih enzima je manje nego u hroničnom hepatitisu (AST  $<300$  U/L, ALT  $<200$  U/L, GLDH dva puta veća od gornje granice referentnih vrednosti), a s obzirom da napredovanjem bolesti dolazi do propadanja hepatocita, katalitičke aktivnosti enzima se sve više smanjuju, tako da u terminalnoj fazi mogu biti čak i manje od referentnih vrednosti. Kao posledica stvaranja fibroznog tkiva dolazi do poremećaja cirkulacije i nastanka portalne hipertenzije sa nekrozom hepatocita što vodi funkcionalnoj insuficijenciji jetre. Promene koje ukazuju na smanjenu sintetsku funkciju i na razvoj akutne hepaticne insuficijencije su: smanjena aktivnost ChE; povećani serumski gama-globulini i fuzija  $\beta$ - i  $\chi$ -frakcije, visoke koncentracije IgG i IgA i smanjenje koncentracije albumina, snižena koncentracija haptoglobina i transferina, produženo PT (posebno sniženje FV je loš prognostički znak), snižena koncentracija holesterola, hiperglukagonemija i hiperinsulinemija, hipoglikemija zbog poremećenog procesa glukoneogeneze i glikogenolize, sniženje koncentracije Apo-A I, snižena koncentracija uree i povećana koncentracija amonijaka u serumu (1, 26). Hipoalbuminemija i smanjenje limfne drenaže je uzrok stvaranja ascitesa i edema, što se manifestuje poremećajem koncentracije elektrolita u serumu (smanjenje koncentracije Na, K, Ca, Cl i P).

U dekompenzovanoj cirozi koncentracija bilirubina varira od normalnih vrednosti do 300–700  $\mu$ mol/L. Može se javiti iolestaza uz umereno povećanje aktivnosti ALP i  $\gamma$ GT, kao i ukupnog i konjugovanog

bilirubina. Povećana koncentracija žučnih kiselina se zadržava duže vreme ali nema veći dijagnostički značaj. Kod bolesnika sa kliničkom i laboratorijskom slikom ciroze, neophodno je dodatnim ispitivanjima utvrditi metaboličku funkciju jetre i uraditi biopsiju za postavljanje konačne dijagnoze. U cirozi jetre dolazi i do *povećanja*: sedimentacije eritrocita, koncentracije uree zbog hepatorenalnog sindroma ili gastrointestinalnog krvarenja, koncentracije kreatinina zbog hepatorenalnog sindroma, aktivnosti amilaze u slučaju pridruženog pankreatitisa, AFP posebno u slučajevima hepatocelularnog karcinoma (HCC), jer godišnje oko 2–5 % bolesnika sa cirozom razvije HCC. Tokom ciroze dolazi i do *snižanja*: hemoglobina zbog gastrointestinalnog krvarenja, broja leukocita i trombocita kao i poremećaja njihove funkcije zbog hipersplenizma, diseminovane intravaskularne koagulacije zbog poremećene sinteze faktora koagulacije, inhibitora koagulacije i parametara fibrinolize. Savremena kliničko laboratorijska ispitivanja u okviru mnogobrojnih studija teže da naprave najkompleksniji algoritam za postavljanje dijagnoze i praćenje toka bolesti kako bi se dobili najosetljiviji i najspecifičniji modeli ispitivanja a izbegla biopsija kao jedino definitivno rešenje (19, 27). U tom pravcu došlo se do nekoliko matematičkih algoritama koji su zastupljeni u mnogobrojnim kliničkim laboratorijama i imaju svoje mesto u rutinskoj dijagnostici ciroze jetre. *APRI index* uključuje ispitivanje odnosa AST/ALT i broja trombocita, *Glyco-Cirrho Test* uključuje ispitivanje nivoa glukagona i insulinsku rezistenciju, *PGA index* obuhvata određivanje PT,  $\gamma$ GT i Apo-A I i njihovo svrstavanje u 4 kategorije, a skor svakog parametra učestvuje u ukupnom PGA indexu (kod pacijenata sa razvojem ciroze PGA indeks iznosi 0–12) (28, 29). *PGAA index* uz parametre koje sadrži PGA indeks uključuje i određivanje  $\alpha_2$ -makroglobulina. *MDA score* obuhvata ispitivanja fibronektina, ALT, ChE, PT, Mn-superoksid dismutaze (marker oksidativnog stresa, koji je impliciran u patogenezi hroničnih oboljenja jetre), kao i N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze (marker razvoja hroničnog hepatitisa u cirozu, učestvuje u sintezi kolagena). Najnovija neinvazivna alternativa biopsiji je *Fibro test-Acti test (FT-AT)* koji obuhvata određivanje 6 biohemijskih markera ( $\alpha_2$ -makroglobulin, haptoglobin,  $\gamma$ -GT, ukupni bilirubin, Apo-A I i ALT), koji pokazuju najveću osetljivost, specifičnost kao i najbolju prediktivnu vrednost u dijagnostikovanju ciroze. FT-AT je kontinuirana linearna biohemijska procena nivoa fibroze i nekroinflatorne aktivnosti koja kvantifikuje stepen fibroze od 0 do 1 u skladu sa METAVIR scoring sistemom koji klasifikuje fibrozu prema stepenu razvoja od F0 do F4 i nekroinflamaciju od nivoa A0 do A3 (26, 30). *SNCF score* uključuje određivanje PT i svih navedenih markera Fibro test-Acti testa i uz ultrazvuk može da zameni 95 % biopsija jetre.

### Preporuke

1. Markere ciroze treba pratiti na svakih 3–6 meseci: AST/ALT, albumin, PT i broj trombocita, ChE i  $\gamma$ -GT. U akutnoj fazi ciroze ove testove treba određivati na svake 4 nedelje.
2. Alternativa biopsiji jetre – određivanje PGA indexa ili Fibro test-Acti testa (27–30).
3. Biopsija je metoda izbora za dijagnozu ciroze jetre (7–9).
4. Marker procesa fibroze se određuju samo u istraživačke svrhe i to: HA, PIIIP, C IV, MMP, TIMP (7).

### Tumori jetre

Tumori jetre uključuju primarne i sekundarne (metastatske) tumore, pri čemu se razlikuju benigni i maligni tumori. Benigni tumori uključuju hepatocelularni adenom, tumorske lezije, hemangiom i tumore holangiocelularnog porekla, dok maligni tumori uključuju hepatocelularni karcinom (HCC), holangiokarcinom, epitelni hemangioendotelion, primarni limfom jetre, angiosarkom i metastatski tumor jetre (2). Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničke slike, primenom UZ, CT, ili MR dijagnostičkih metoda, biopsijom jetre i na osnovu vrednosti tumorskih markera u prvom redu:  $\alpha$ -fetoproteina (AFP), karcinoembrionalnog antigena (CEA) i des- $\gamma$ -karboksi protrombina (DCP) (18, 31).

*Primarni karcinom jetre* se deli u tri grupe: HCC (karcinom nastao od hepatocita), holangiokarcinom (nastao od ćelija epitela žučnih puteva) i mešoviti tip (hepatoholangiocelularni karcinom). HCC je najčešći oblik malignog tumora i može se razviti kao posledica ciroze jetre, hepatitisa B i C, nekih toksina (alfatoksin), deficita  $\alpha_1$ AT, hemohromatoze. Uočena je pojava HCC kod hroničnih HCV pacijenata kao i kod asimptomatskih HBV prenosioca ali bez razvijene ciroze. S obzirom da se HCC može razviti nakon ciroze navedenih uzročnika, preporučuje se ispitivanje obolelih sa hroničnim oštećenjem jetre i onih kod kojih već postoji ciroza radi ranog otkrivanja pojave tumora. Maligni rast često prati i inflamatorni proces, pa se u serumu povećava koncentracija reaktanata akutne faze, kao npr.  $\alpha_2$ -globulina, raznih glikoproteina, a ubrzana je i sedimentacija eritrocita. Aktivnost ALP je značajno povećana, dok su aminotransferaze umereno povećane, pri čemu je aktivnost AST veća od ALT (De Ritisov koeficijent je 3–4). Koncentracija bilirubina je povećana, a za razliku od opstruktivne žutice izazvane kamencima gde bilirubin varira, kod tumora se koncentracija bilirubina kontinuirano povećava sa njegovim rastom. Aktivnost LDH je obično normalna u cirozi, međutim u slučaju malignih oboljenja jetre aktivnost enzima se drastično povećava (dva i više puta u odnosu na referentne vrednosti). Rast infiltrata dovodi do holestaze i porasta aktivnosti enzima:  $\gamma$ -GT > ALP > LAP. Usled smanjene sintetske funkcije jetre snižava se aktivnost ChE za 20–50%, smanjuju se koncentracije albumina, faktora koagulacije, holestaze



rola, Fe, TIBC. Iako ove promene nisu specifične za tumor, mogu poslužiti kod potvrda dijagnoze. Najvažniji tumorski marker koji se koristi u dijagnostici HCC, monitoringu terapije i praćenju kliničkog toka bolesti je  $\alpha$ -fetoprotein (AFP). Povišene vrednosti AFP se javljaju u nekim regenerativnim procesima jetre, u akutnom i hroničnom hepatitisu, kod ciroze nastale u alkoholnom hepatitisu (100–400 mg/L), dok u fulminantnom hepatitisu dostižu vrednost do 1000  $\mu$ g/L (RIA metoda) (32, 33). Dugotrajna ispitivanja pokazuju da pacijenti sa cirozom i sa abnormalno velikom vrednošću AFP (>500  $\mu$ g/L) imaju veliki rizik od razvoja primarnog hepatocelularnog karcinoma (34). Kod jednog broja pacijenata sa dijagnostikovanim HCC mogu se uočiti normalne vrednosti AFP i to su uglavnom asimptomatski tumori bez izražene ciroze. Kod bolesnika sa hroničnom HCV infekcijom vrednosti AFP iznad 100  $\mu$ g/L u serumu upućuju na visok rizik od nastanka HCC. Serumska vrednost iznad 500  $\mu$ g/L sigurno ukazuje na HCC, ali ispod ove vrednosti postoji veliko preklapanje između pacijenata koji su anti-HCV pozitivni i onih sa HCC. Kod 70–90 % obolelih od HCC AFP je veći od 500  $\mu$ g/L, dok u drugim malignim bolestima (karcinom dojke, bronha, debelog creva sa metastazama) iznosi oko 100  $\mu$ g/L (31, 35). Povećanje AFP naročito u preterminalnoj fazi bolesti ne mora uvek da prati rast tumora a koncentracija može i da padne usled jake nekroze tkiva. Literaturni podaci ukazuju na niz različitih vrednosti za razlikovanje ciroze jetre od HCC (cutoff 30  $\mu$ g/L – RIA), kao i za razlikovanje HCC od metastaza ostalih tumora (cutoff 100  $\mu$ g/L) (18, 31). Ovakvo niska osetljivost AFP, kao i »siva zona« između 50 i 500 mg/L ukazuje na njegovu malu dijagnostičku vrednost i neophodnost istovremenog korišćenja ostalih dijagnostičkih metoda (UZ, CT), posebno u dijagnostici ranih i malih tumora. Za otkrivanje ranih tumora veliki značaj ima metoda izoelektrofokusanja kojom je moguće razdvojiti i detektovati *izoforme AFP III i IV* koje su specifične za inicijalnu fazu nastanka HCC, i to nekoliko meseci pre porasta ukupnog AFP i mogućnosti detekcije ultrazvukom (18, 34). Za praćenje efekata terapije preporučuje se određivanje više tumorskih markera čije povećanje koncentracije ukazuje na neodgovarajući tretman tumora i progresiju bolesti u pravcu nastanka recidiva ili metastaza. U nekim slučajevima čak i dobijeni negativni rezultati AFP ne isključuju mogućnost progresije bolesti. Postoperativno sniženje koncentracije AFP uz fiziološki poluživot manji od 5 dana ukazuje na kompletno uklanjanje tumora. Kod jednog broja bolesnika sa malignim bolestima jetre povećana je i vrednost *karcinoembrionalnog antigena (CEA)*. Za razliku od nemalignih bolesti u kojima se uočava blago povećanje ovog tumorskog markera (inflamatorne bolesti jetre, alkoholna ciroza), kod malignih promena nivo CEA raste neprekidno sa progresivnim rastom tumora. Vrednosti CEA iznad 10  $\mu$ g/L (EIA) ukazuju na postojanje maligne promene. Najveću primenu CEA ima u diferencijalnoj dijagnozi tumora

jetre i praćenju efekata terapije. Istovremeno određivanje AFP i CEA u serumu omogućava razlikovanje HCC od metastatskih karcinoma jetre (1, 5, 35). *Metastatski karcinom jetre* je najčešći tumor jetre (2/3 malignih bolesti jetre su metastaze drugih tumora) budući da karcinomi drugih organa (pankreas, debelo crevo, želudac, dojke, ovarijumi) često metastaziraju u jetri. Klinička slika zavisi od mesta primarnog tumora kao i od veličine i lokalizacije metastaza u jetri. Često se u laboratorijskim nalazima vidi povećana aktivnost ALP i LDH. Kod metastatskih bolesti AFP je manje povišen nego u primarnom karcinomu jetre, za razliku od CEA čije se vrednosti u slučaju metastaza u jetri naglo povećavaju. U cilju praćenja postoperativnog toka neophodno je serijsko određivanje CEA u toku 6–8 nedelja i ako se vrednosti ne vraćaju na početni nivo u pitanju je rezidualni tumor (7, 9). Kao tumorski marker izbora za dijagnostikovanje holangiocelularnog karcinoma koristi se CA-19-9. U savremenoj kliničko laboratorijskoj dijagnostici sve veću ulogu ima određivanje *des- $\gamma$ -karboksi protrombina (DCP ili PIVKA II)* koji predstavlja oblik protrombina kod koga nije došlo do  $\gamma$ -karboksilacije glutaminskih ostataka (18, 31) i povećan je kod HCC. Ovaj marker se smatra manje osetljivim ali specifičnijim tumorskim markerom od AFP u diferencijalnom dijagnostikovanju HCC od nemalignih hroničnih jetrenih bolesti (7). DCP je najznačajniji prediktor portalno venske opstrukcije i pojave mikrovaskularnih tromboza kod malignih oboljenja jetre. Nedostatak određivanja DCP je nedovoljna osetljivost za dijagnostikovanje tumora u početnoj fazi razvoja (manjih od 2 cm), pa se kao primarni marker u ovim slučajevima koristi AFP i njegove izoforme III i IV. Zato je preporuka da se u dijagnostici malignih oboljenja jetre istovremeno određuju DCP i AFP. Istovremenim određivanjem oba tumorska markera (cutoff vrednosti za AFP 40 ng/mL, RIA metoda i 80 mU/mL za DCP, EIA metoda) postiže se povećana osetljivost 65,5 %, specifičnost 85,5 %, čime se može otkriti HCC do 3 meseca pre pojave kliničkih simptoma (36).

#### Preporuke

1. Kod hroničnih HbsAg nosioca i inficiranih sa HCV najmanje jednom (najbolje dva puta) godišnje uraditi AFP a kod ostalih rizičnih grupa (teške forme hroničnog hepatitisa, ciroze izazvane alkoholom, hemohromatoze) proveriti AFP i UZ dva puta godišnje.
2. Nakon primenjene terapije određivanje CEA svaka 2 meseca u toku 2 godine (7).

#### Ostali uzročnici hroničnog hepatitisa

##### *Nealkoholni steatohepatitis (NASH)*

Hronično oboljenje slično alkoholnom hepatitisu, praćeno steatozom, parenhimskom inflamacijom i različitim oblicima fibroze, kod pacijenata koji nisu korisnici alkohola, definiše se kao nealkoholni steato-

hepatitis. Bolest je multifaktorijske patogeneze, a glavni rizični činioci su lekovi: estrogeni, kortikosteroidi, hlorokin otrovi, kao i nasledni i stečeni poremećaji metabolizma (Wilsonova bolest, abetalipoproteinemija, hipobetalipoproteinemija). NASH je najčešći uzrok hroničnog hepatitisa kada se izuzmu virusi i alkohol, i najčešći uzrok kriptogene ciroze (37). Uglavnom se javlja kod žena srednjih godina koje imaju povećanu telesnu težinu i/ili dijabetes. Dijagnoza se postavlja nakon isključenja pre svega alkoholne bolesti jetre. Mnoge osobe sa povišenim vrednostima ALT imaju simptome steatoze bez kompletne histološke slike NASH (38). Za razliku od alkoholnog hepatitisa, NASH ima više vrednosti ALT nego AST,  $AST/ALT < 1$  (izuzev kod osoba sa cirozom), blaže povećanje  $\gamma$ -GT i ALP, dok su vrednosti albumina, PT i bilirubina u granicama referentnih vrednosti. Kod 25–75 % bolesnika se može naći hiperglikemija, hiperholesterolemija i hipertrigliceridemija (39). Budući da je aktivnost enzima nespecifična za postavljanje dijagnoze neophodno je koristiti markere specifične za alkoholizam, kao što je mAST,  $\gamma$ -GT i CDT. S obzirom da se tokom progresije ovog oboljenja javlja i fibroza tkiva, određivanje markera fibroze je od velikog dijagnostičkog značaja. Marker koji pokazuje najbolju korelaciju sa kliničkim simptomima fibroze su 7S fragment tipa kolagena IV i hijaluronska kiselina, i oni se mogu koristiti upravo za diferencijalnu dijagnozu NASH od masne jetre drugog porekla. Biopsija jetre je zlatni standard (7, 18).

#### Preporuke

1. Biopsija jetre je neophodna za potvrdu dijagnoze NASH (7).

### Metaboličke bolesti jetre

#### Familijarne hiperbilirubinemije

Bolesti metabolizma bilirubina ili familijarne hiperbilirubinemije su oboljenja karakteristična po izolovanom povećanju koncentracije bilirubina bez promena aktivnosti aminotransferaza i ALP. Dijagnostičke smernice u diferencijalnoj dijagnozi familijarnih hiperbilirubinemija se temelje na određivanju direktnog i indirektnog bilirubina (1).

*Dubin-Johnsonov sindrom.* Autosomno recesivno, benigno oboljenje, karakteristično po povećanju konjugovanog bilirubina i neznatnom povećanju nekonjugovanog u pubertetu i do 20. godine života. Koncentracija bilirubina je oko 90  $\mu$ mol/L, a poremećaj nastaje zbog otežanog izlučivanja bilirubina u žuč. U hepatocitima je prisutan tamno smeđi pigment sličan lipofuscinu. Urinarna ekskrecija urobilinogena i koproporfirina I je povećana, dok je ekskrecija koproporfirina III smanjena.

*Rotorov sindrom.* Smatra se genetskom varijantom Dubin-Johnsonovog sindroma ali nema sme-

đeg pigmenta u hepatocitima. Povećan je konjugovani bilirubin. Urinarna ekskrecija urobilinogena i koproporfirina I i III je povećana, što služi za razlikovanje ovog tipa konjugovane hiperbilirubinemije od Dubin-Johnson-ovog sindroma.

*Gilbertov sindrom.* Oboljenje nastaje kao posledica smanjene aktivnosti UDP-glukuronil transferaze (UGT-1A). Povećana je koncentracija nekonjugovanog bilirubina do 51  $\mu$ mol/L. Dijagnoza se postavlja nakon gladovanja (povećanje bilirubina) ili nakon davanja fenobarbitona (smanjenje bilirubina).

*Crigler-Najjarov sindrom.* Tip 1 se nasleđuje autosomno recesivno, posledica je potpunog nedostatka UDP-glukuronil transferaze. Povećana je koncentracija nekonjugovanog bilirubina ( $> 428 \mu$ mol/L) i većina bolesnika umire u toku prve godine života. Tip 2 je uzrokovan delimičnim nedostatkom istog enzima, koncentracija nekonjugovanog bilirubina se kreće između 43 i 342  $\mu$ mol/L i oboleli mogu imati normalan životni vek.

*Luceu-Driscollov sindrom.* Nasledni oblik nekonjugovane hiperbilirubinemije, uzrokovan je prisustvom inhibitora konjugacije bilirubina. Koncentracija nekonjugovanog bilirubina je umereno povećana (oko 85  $\mu$ mol/L) i traje prve 2–3 nedelje života.

#### Preporuke

Nakon isključenja hemolitičke bolesti i uz normalne vrednosti AST, ALT i ALP:

1. Određivanje koncentracije ukupnog i konjugovanog bilirubina (2).

#### Hemohromatoza

Primarna nasledna hemohromatoza je autosomno, recesivno oboljenje kod koga se gvožđe apsorbira u crevima u povećanoj količini i deponuje u parenhimskim organima kao što su: jetra, koža, pankreas, srce i endokrine žlezde. Učestalost hemohromatoze u zapadnoj Evropi je oko 6 % i to 0.45 % homozigota (1 od 220 osoba) i 11 % heterozigota (1 od 9 osoba) i čini je jednom od najčešćih urođenih bolesti metabolizma (1, 40). Uzrok nasledne hemohromatoze je mutacija HFE gena na šestom hromozomu. Najveći broj inficiranih su homozigoti sa mutacijom C282T dok je manji broj heterozigota sa C282T i H63D mutacijom. Tačan mehanizam hemohromatoze je nepoznat, ali postoji veza između njene pojave i interakcije transmembranskog proteina sa transferinom i transportovanja gvožđa preko epitelne površine. Jetra preuzima Fe pomoću transferina, i sa povećanjem preuzimanja Fe javlja se nishodna regulacija transferinskog receptora (TfR). Kod pacijenata sa naslednom hemohromatozom nastavlja se preuzimanje Fe uprkos nishodnoj regulaciji TfR. U hemohromatozi Fe svojim deponovanjem prevazilazi kapacitet organizma da stvara helate Fe i slobodno Fe ko-

je se nakuplja dovodi do oštećenja hepatocita, pojačane fibrozne reakcije, pigmentne ciroze jetre i pigmentacije kože. Od biohemijskih markera karakteristično je povećanje: koncentracije serumskog Fe (preko 30  $\mu\text{mol/L}$ ), saturacije transferina ( $\text{Fe/TIBC} \times 100$ ) obično veće od 75 % (cutoff >45 %) i feritina (>200  $\mu\text{g/L}$  za žene i >300  $\mu\text{g/L}$  za muškarce, uglavnom >1000  $\mu\text{g/L}$ ), dok je koncentracija transferrina, TIBC i slobodnog kapaciteta vezivanja Fe smanjena (UIBC-cutoff <28  $\mu\text{mol/L}$ ) (7, 9, 18). Nejasne slučajeve treba potvrditi biopsijom jetre i određivanjem koncentracije Fe u uzorku suvog jetrenog tkiva. Vrednosti indeksa Fe u jetri (koncentracija Fe u jetri u  $\mu\text{mol/L/g}$  godine života) veći od 1,9 potvrđuju dijagnozu. Ispitivanje se treba sprovesti kod svih rođaka prve linije starijih od 20 godina. Rano otkrivanje ove bolesti i primena terapije omogućava preživljavanje, dok kod bolesnika sa razvijenom cirozom postoji visoki rizik od razvoja hepatocelularnog karcinoma. Heterozigoti mogu imati blagi porast akumulacije Fe koji ne znači rizik za manifestaciju bolesti. Sekundarna hemohromatoza pojavljuje se u nizu stanja poput čestih transfuzija krvi, neefektivne eritropoeze, talasemije, alkoholne bolesti jetre i porfirije kutanea tarda. Terapija se sprovodi flebotomijom, 3 do 4 puta godišnje, kako bi se uklonio višak Fe. Nedeljno se uklanja 500 mL krvi dok se ne postignu vrednosti hematokrita od 35 do 40, koncentracija Fe manja od 30  $\mu\text{mol/L}$  i koncentracija feritina manja od 200  $\mu\text{g/L}$ .

#### Preporuke

1. Inicijalna procena hemohromatoze moguća je na osnovu saturacije transferina ili nezasićenog kapaciteta vezivanja gvožđa. Saturacija transferina >45% ili nezasićen kapacitet vezivanja gvožđa <28  $\mu\text{mol/L}$  ukazuju na hemohromatozu.
2. Genetska analiza za postavljanje definitivne dijagnoze (7).

#### Wilsonova bolest

Wilsonova bolest je autosomni recesivni poremećaj metabolizma bakra karakterističan po deponovanju toksičnih koncentracija bakra u tkivima i organima, najčešće u jetri, mozgu i očima. Bolest je izazvana mutacijom ATP7B gena na trinaestom hromozomu koji kodira Wilsonovu ATP-azu neophodnu za transport bakra. Zbog nemogućnosti ugradnje bakra u ceruloplazmin i insuficijencije bilijarne ekskrecije bakra dolazi da nakupljanja bakra u raznim organima, te su kliničke manifestacije bolesti: hronični hepatitis, ciroza jetre, neurološki i psihički poremećaji, kao i tipični Kayser-Fleischer-ovi prstenovi u kornei. Kod mnogih pacijenata kod kojih se bolest manifestuje kao oboljenje jetre, izostaju neurološke manifestacije. Najčešći dijagnostički nalaz je nizak nivo ceruloplazmina u krvi (<0,17  $\text{g/L}$ ). Niske vrednosti ceruloplazmina se javljaju i u malnutriciji, pri gubitku proteina i u trudnoći dok u akutnoj inflamaciji njegova koncen-

tracija kao proteina akutne faze može biti povećana i predstavljati lažno negativan rezultat. Nizak nivo ceruloplazmina zabeležen je kod 95% homozigota i 20% heterozigota. Drugi očekivani nalazi kod Wilsonove bolesti su povišena koncentracija slobodnog bakra u serumu (>7  $\mu\text{mol/L}$ ), smanjena koncentracija ukupnog bakra, povećana ekskrecija bakra urinom (do 20  $\mu\text{mol/24h}$ ), povišena koncentracija bakra u jetrenom tkivu (do 40  $\mu\text{mol/g}$  suvog tkiva jetre) (18, 41). Zbog oštećenja bubrega javlja se opšta tubularna aminoacidurija uz glukozuriju i fosfaturiju, a u uznapredovalim slučajevima i renalna tubularna acidoza. Bolest se leči sa helatnim agensima (D-penicilinamin). Oboljenja sa teškim hepatocelularnim oštećenjem su praćena sniženom sintezom ceruloplazmina, dok hepatična nekroza saolestazom dovodi do povećanog oslobađanja bakra iz jetre i njegove povećane koncentracije u plazmi i u urinu, te u ovakvim slučajevima dolazi do otežane interpretacije rezultata u diferencijalnoj dijagnostici. Kao glavni diskriminacioni test koristi se određivanje koncentracije bakra u 24h urinu, nakon administracije D-penicilamina, pri čemu je ekskrecija bakra u slučaju Wilsonove bolesti veća od 30  $\mu\text{mol/24h}$ , a kod drugih jetrenih bolesti ne prelazi 15  $\mu\text{mol/24h}$ .

#### Preporuke

Testiranje na Wilsonovu bolest se radi kod pacijenata starijih od 40 godina koji imaju hronično oboljenje jetre ili uvećanu jetru, a negativni su na virusni hepatitis, lekovima izazvan hepatitis i hemohromatozu.

1. Određivanje koncentracije ceruloplazmina u serumu i koncentracije Cu u 24 h urinu.
2. Biopsija jetre i određivanje konc. Cu u suvom tkivu.
3. Kod nejasnih slučajeva genetska analiza (7).

#### Deficijencija alfa-1-antitripsina ( $\alpha_1\text{AT}$ )

Deficit  $\alpha_1\text{AT}$  je autosomni recesivni poremećaj karakterističan po značajno niskim vrednostima  $\alpha_1$ -antitripsina.  $\alpha_1\text{AT}$  je glikoprotein koji se sintetiše u jetri i pripada familiji inhibitora proteaza. Urođena deficijencija se javlja kod prosečno 1 od 1000 osoba u Evropi. Gen za  $\alpha_1\text{AT}$  je lociran na četrnaestom hromozomu i do sada je identifikovano preko 90 njegovih alela (4). Genotipovi  $\alpha_1\text{AT}$  se označavaju prisustvom odgovarajućih proteina označenih sa M, Z, S koji se međusobno razlikuju po jednom aminokiselinskom ostatku. Na ovaj način je moguće razlikovati genotipove: PiMM, PiZZ, PiSS, PiMZ, PiZS i PiMS. Najčešći alel je PiM, a homozigotni genotip PiMM pojavljuje se u 90 % slučajeva i praćen je koncentracijom  $\alpha_1\text{AT}$  u referentnom opsegu. Alelna varijanta Pi Z, odnosno homozigotni Pi ZZ genotip kodira  $\alpha_1\text{AT}$  sa samo 10 % vrednosti od normalne koncentracije. PiMZ heterozigoti imaju intermedijerne vrednosti  $\alpha_1\text{AT}$ . Deficijencija  $\alpha_1\text{AT}$  je povezana sa emfize-

mom i neonatalnim hepatitisom, kao i sa hroničnim oboljenjem jetre, cirozom i hepatocelularnim karcinomom. Gotovo sva novorođenčad genotipa PiZZ već na rođenju ima oboljenje jetre koje progredira do 12. godine. Kod odraslih PiZZ pozitivnih u 50% slučajeva se razvija ciroza, a u 31% hepatocelularni karcinom. Dokazano je da PiZ heterozigotni fenotip ne uzrokuje direktno oštećenje jetre, ali povećava osetljivost za oštećenje jetre drugim agensima (naročito virusima). S obzirom da je  $\alpha_1$ AT reaktant akutne faze, vrednosti mogu biti lažno normalne kod infekcije ili zapaljenja, lažno smanjene kod malnutricije, u slučaju gubitka proteina ili završnom stadijumu oboljenja jetre. Prilikom testiranja deficita  $\alpha_1$ AT trebalo bi pre raditi analizu fenotipa nego određivanje kvantitativne koncentracije u plazmi (7, 42). Deficit  $\alpha_1$ AT se uočava nakon elektroforetskog razdvajanja serumskih proteina, po smanjenoj traci  $\alpha_1$ -globulina.  $\alpha_1$ AT se kvantitativno može odrediti imunološkim i enzimskim merenjima, a fenotipizacija se radi metodom izoelektrofokuseriranja na poliakrilamidnom gelu. Tačna dijagnoza se postavlja genotipizacijom, odnosno otkrivanjem homozigotnih i heterozigotnih nosilaca mutacije  $\alpha_1$ AT gena.

#### Preporuke

Ispitivanje deficita  $\alpha_1$ AT je od značaja kod pacijenata kod kojih su isključeni svi drugi uzroci hroničnog hepatitisa, ciroze jetre i emfizema pluća. Ispitivanja su veoma važna kod novorođenčadi kod kojih je ustanovljeno oboljenje jetre (produžena žutica nepoznatog porekla).

1. Određivanje koncentracije  $\alpha_1$ AT u serumu.
2. Fenotipizacija (ukoliko je koncentracija  $\alpha_1$ AT u serumu manja za 20 % od donje granice referentnih vrednosti).
3. Genotipizacija (kada fenotip ne odgovara dijagnostičkoj prezentaciji bolesti, u prenatalnoj dijagnostici).

#### Reyeov sindrom

Reyeov sindrom je bolest koja se definiše kao akutna, neinflamatorna encefalopatija udružena sa masnom degeneracijom jetre, nepoznate etiologije. Manifestuje se najčešće kod dece između 2. i 13. godine. Osnovna karakteristika sindroma je opšta mitohondrijalna disfunkcija posebno provocirana dejstvom nekih lekova (aspirin), toksina, ili virusa (boginje, grip). Klinički simptomi su: povraćanje, neurološki poremećaji, uvećanje jetre sa masnim infiltracijama, nekrozom iolestazom, akutna encefalopatija usled nakupljanja amonijaka i cerebralni edem kao uzrok smrti (43). Mnogobrojne urođene greške metabolizma koje su uglavnom posledica enzimskih deficita, pokazuju slične kliničke manifestacije i u prvim godinama života mogu pogrešno upućivati na Reyeov sindrom (44). To su najčešće: deficit ornitintranскарbamilaze, primarni deficit karnitina, metil-malonska acidemija, poremećaji metabolizma glikogena i dr. Pravovremenim postavljanjem dijagnoze ovih bolesti

moguće je isključiti Reyeov sindrom kao uzrok poremećaja i odgovarajućim tretmanom sprečiti komplikacije. Biopsija jetre pokazuje ultrastrukturne promene hepatocita, sa morfološki izmenjenim mitohondrijama, žutu ili belu boju tkiva, i mikrovezikularnu akumulaciju masti, što nije karakteristika enzimski deficitarnih urođenih metaboličkih bolesti. Laboratorijski rezultati ukazuju na povećanu aktivnost transaminaza, povećan De Ritis-ov koeficijent uz normalnu koncentraciju bilirubina, smanjenu koncentraciju glukoze, povećanu koncentraciju amonijaka, kao i aminokiselina. Specifična je promena lipidnog statusa, sa izraženo povećanom koncentracijom slobodnih masnih kiselina (zasićenih i polinezasićenih) u krvi (45, 46). Organska acidemija kao posledica akumulacije organskih kiselina kratkih lanaca (propionske, metilmalonske, izovalerijanske) ukazuje na oštećenje hepatocita i poremećaj metaboličkih procesa kao što su  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina, inhibicija enzima karbamoil fosfat sintetaze I, piruvat dehidrogenaze, piruvat karboksilaze, sinteza karbamoil fosfata, ornitina, oksalacetata i dr. što istovremeno vodi daljem poremećaju mitohondrijalnog metabolizma. PT je produženo i ne reaguje na terapiju vitaminom K. Lečenje se sprovodi tretmanom žutice i davanjem manitola kao osmotskog diuretika da bi se sprečio nastanak cerebralnog edema koji je najčešći uzrok smrti.

#### Preporuke

Diferencijalnom dijagnostikom (analizom aminokiselina, masnih i organskih kiselina u plazmi i/ili urinu, enzimskom analizom fibroblasta) isključiti urođene metaboličke greške kao i ostale uzroke oštećenja jetre.

1. Određivanje AST i ALT, glukoze, PT, amonijaka i slobodnih masnih kiselina.
2. Biopsija jetre.

#### Autoimune jetrene bolesti

##### *Autoimuni hepatitis (AIH)*

Autoimuni hepatitis je hronična upala jetre, češća kod žena, karakteristična histološki po periportalnom oštećenju parenhima i prisustvu određenih autoantitela. AIH je odgovoran za 18% svih slučajeva hroničnog hepatitisa koji nisu prouzrokovani virusima ili alkoholom. Dijagnoza AIH zahteva isključenje drugih hroničnih bolesti jetre i imunih holangiopatija kao što su primarna bilijarna ciroza i primarni sklerozni holangitis. Opisano je nekoliko tipova AIH (47). *Tip 1* je najčešći oblik i otkriven je kod žena mlađih i srednjih godina. Povezan je sa visokim titrom *anti-nuklearnih At (ANA) i/ili glatkomišićnih antitela (ASMA)*. *Tip 2* je vrlo čest u zapadnoj Evropi i primarno je otkriven kod dece. *Tip 2* je pozitivan na *At na jetreno-bubrežni mikrozomalni Ag (anti-LKM)*, a retko pozitivan na ANA ili ASMA. Mnogi pacijenti koji imaju tip 2 imaju i HCV infekciju. *Tip 3* je otkriven pri-

marno kod mlađih žena, povezan je sa sistemskim autoimunim oboljenjem i pozitivan na *At na solubilni-jetreni Ag (anti-SLA)*. 90 % pacijenata ima i prisutna nespecifična *perinuklearna anti-neutrofilna citoplazmatska At (pANCA)*. 30 % pacijenata sa AIM istovremeno ima i neku drugu autoimunu bolest (reumatoidni artritis, Gravesova bolest). U postavljanju dijagnoze AIH neophodno je pratiti određene kriterijume: ispitivanja kod najčešćeg *tipa 1* uključuju povišene transaminaze, minimalno povišenu ili normalnu ALP; poliklonalnu hipergamaglobulinemiju sa povećanom koncentracijom IgG; odsustvo virusne infekcije ili infekcije izazvane upotrebom lekova ili alkohola; pozitivan ANA i/ili ASMA. Približno 40% pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom ima pozitivan ANA i/ili ASMA (obično u malom titru). Terapija obolelih od AIH se sprovodi primenom imunosupresiva (kortikosteroida) kojima se postižu dobri rezultati i bolest dovodi u stanje remisije, sa padom titra ANA i ASMA. Bolest može progredirati u cirozu ali vrlo retko u HCC (48).

#### Preporuke

Autoimuni hepatitis treba očekivati kod pacijenata sa hroničnim oboljenjem jetre, povišenim imunoglobulinima, odsustvom detekcije: virusnih markera, konzumiranja alkohola, uticaja lekova, hemohromatoze i Wilsonove bolesti.

1. Bazična laboratorijska ispitivanja (AST, ALT, HbsAg i anti-HCV).
2. Dijagnoza AIH se postavlja na osnovu pozitivnih nalaza na ANA ili ASMA (visok titar).

#### *Primarna bilijarna ciroza (PBC)* *i primarni sklerozni holangitis (PSC)*

Primarna bilijarna ciroza i primarni sklerozni holangitis su autoimuna oboljenja koja prouzrokuju oštećenje žučnih puteva. *PBC* je hronična autoimuna holestatska bolest povezana sa destrukcijom malih intrahepatičnih žučnih puteva, mada je često povezan i sa drugi autoimunim oštećenjima kao što su: reumatoidni artritis, tiroiditis i Sjongerov sindrom (čak u 80% slučajeva). Biohemijske analize kod bolesnika sa *PBC* karakteristične su za holestazu. Najranija promena je povećanje aktivnosti ALP jetrenog porekla. Povećanje aktivnosti  $\gamma$ -GT, 5'-NT i umereno povećanje transaminaza nema prognostičkog značaja za

razliku od povećane koncentracije bilirubina koji je loš prognostički znak. Mogu biti povećane koncentracije holesterola, HDL, LDL, VLDL, žučnih kiselina, ceruloplazmina, a snižena koncentracija glukoze i značajan deficit liposolubilnih vitamina (B<sub>12</sub>). Kod gotovo svih pacijenata sa *PBC* pronađen je autoimuni marker označen kao *anti-mitohondrijalna antitela (AMA)*, a pored njih kod 40% pacijenata su prisutna i anti-tiroidna antitela, antitrombocitna antitela i visoka koncentracija IgM (47, 49). Iako se i kod nekih drugih bolesti mogu naći pozitivna AMA, kod *PBC* ova antitela su direktno usmerena prema kompleksu piruvat-dehidrogenaza (M<sub>2</sub> tip AMA), delimično prema dihidrolipoamid acetiltransferazi (E<sub>2</sub>) i E<sub>3</sub>-prenosnom proteinu. Oko 5–10% pacijenata ima istovremeno i AIM i *PBC*. *PBC* se najčešće detektuje kod asimptomatskih pacijenata koji imaju povišenu ALP. Povišene vrednosti ALT i AST su pronađene u otprilike 50% slučajeva, a 20 % pacijenata ima i dva puta više vrednosti aminotransferaza od gornje granice referentnih vrednosti.

*PSC* je bolest koja se češće javlja kod muškaraca srednjeg doba koja prouzrokuje oštećenje i intra- i ekstrahepatičnih žučnih puteva. Progresivna je bolest nepoznate etiologije, karakteristična po holestazi, difuznoj upali i fibrozi često celog bilijarnog trakta. 70% slučajeva je udruženo sa inflamatornim oštećenjem creva (Cronova bolest ili ulcerozni kolitis). Kod 2/3 pacijenata detektovana su *perinuklearna anti-neutrofilna citoplazmatska At (pANCA)*. ANA i ASMA su prisutni u 70 % obolelih ali u manjem titru nego kod AIH. Biohemijski parametri nisu specifični ali ako holestatska enzimska slika traje duže od 6 meseci treba posumnjati na *PSC*. Može se naći hipoalbuminemija, hipergamaglobulinemija, povećana koncentracija IgG, produženo PT. ERCP je metoda izbora za razlikovanje *PBC* i *PSC* (47, 50).

#### Preporuke

Na *PBC* ili *PSC* treba posumnjati kod pacijenata sa nespecifično hronično povišenom alkalnom fosfatazom.

1. Dijagnozu treba potvrditi pozitivnim nalazom na anti-mitohondrijalna antitela (*PBC*) ili pozitivnim nalazom na anti-neutrofilna citoplazmatska antitela (*PSC*).
2. ERCP dijagnostički sistem se koristi u okviru diferencijalne dijagnoze (nespecifičan nalaz kod *PBC*, ali karakterističan za *PSC*) (7, 47).

## LABORATORY DIAGNOSTICS OF CHRONIC LIVER DISEASES

Zorica Šumarac<sup>1</sup>, Violeta Dopsaj<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia*

<sup>2</sup>*Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia & Montenegro*

**Summary:** Chronic liver diseases are conditions that are clinically manifested by duration longer than six months. According to etiological factors, they are classified as follows: infectious (chronic viral hepatitis), toxic (alcoholic hepatitis, drug- and toxin-associated), hereditary metabolic diseases, autoimmune and neoplastic diseases. Pathological changes include: hepatitis, cirrhosis and cholestasis. Diagnosis of these diseases is based on clinical picture, results of medical-biochemical and serological analyses, liver biopsy and other diagnostic methods, such as: ultrasonography, computerized tomography, esophagoduodenoscopy and endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Chronic hepatitis* is a clinical syndrome of heterogenous etiology, i.e., a group of diseases with necroinflammatory process in the liver, often followed by fibrosis and duration of more than six months. The impairment may progress to cirrhosis and hepatocellular cancer. Etiologically, chronic hepatitis is classified into several groups, such as: viral (hepatitis B and hepatitis C), autoimmune hepatitis (types 1, 2 and 3), autoimmune cholestatic diseases (primary biliary cirrhosis-PBC, and primary sclerosing cholangitis-PSC), drug-associated hepatitis, Wilson's disease,  $\alpha_1$ -antitripsine deficit, primary idiopathic hemochromatosis, cryptogenic hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. For differential diagnosis of these diseases, it is essential that initial evaluation includes the complete history of drug usage, alcohol consumption and ALT, AST, HBsAg and anti-HCV measurements. In persons with increased catalytic ALT activity and negative HBsAg and anti-HCV, it is necessary to determine the auto antibodies, Fe, TIBC and UIBC, ceruloplasmin, and  $\alpha_1$ -antitripsine phenotype. The diagnosis of *chronic viral hepatitis* requires determination of catalytic activity of ALT and specific serological tests: HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA, anti-HCV and HCV-RNA. *Alcoholic liver disease* is developed in several phases: from normal liver, through steatosis, alcoholic hepatitis to cirrhosis. In patients with verified history of alcohol consumption, it is necessary to determine the catalytic activity of  $\gamma$ -GT, AST, ALT, MCV and CDT. Determination of CDT and  $\gamma$ -GT is needed for monitoring of therapeutical effects, while liver biopsy is required for definite diagnosis. *Cirrhosis* is the end-stage of chronic liver diseases, and the most frequent causes are: acute and viral hepatitis, long-term and excessive alcohol consumption, metabolic and biliary diseases, autoimmune hepatitis, effects of drugs, chemical agents, etc. Chronic hepatitis developing to cirrhosis is characterized by two basic processes: necroinflammatory impairment and fibrosis. Necrotic inflammation is characterized by higher De Ritis coefficient with considerably higher activity of  $\gamma$ -GT and LDH. Reduced synthetic function is indicated by: lower ChE activity, decreased albumin concentration with predominant serum gamma-globulin and high IgG and IgA concentrations, lower concentrations of haptoglobin and transferrin as well as longer prothrombin time. Although liver biopsy is considered the method of choice for diagnosis of hepatic cirrhosis, determination of PGA index or Fibro test-Acti test ( $\alpha_2$ -macroglobulin, haptoglobin,  $\gamma$ -GT, total bilirubin, Apo-A I and ALT) is recommended as the alternative to biopsy, which exhibits the highest sensitivity, specificity as well as best predictive value for diagnosis of cirrhosis. *HCC* is the most common form of *malignant liver tumors* and may be the result of hepatic cirrhosis due to effects of hepatitis B and C, some toxins,  $\alpha_1$ AT deficit or hemochromatosis. Diagnosis is based on clinical picture, US, CT and MR imaging, liver biopsy and values of tumor markers, primarily:  $\alpha$ -fetoprotein, carcinoembryonic antibody, and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin. The changes of biochemical parameters are not specific for tumor, but may serve to substantiate the diagnosis. In patients who are not alcohol consumers, chronic disease similar to alcoholic hepatitis, followed by steatosis, parenchymal inflammation and different forms of fibrosis is defined as *non-alcoholic steatohepatitis (NASH)*. Liver biopsy is crucial for verification of NASH diagnosis. *Metabolic liver diseases* include: familial hyperbilirubinemia, primary hereditary hemochromatosis, Wilson's diseases, alpha-1-antitripsin deficiency, Reye's syndrome, etc. Diagnostic guidelines for differential diagnosis of *familial hyperbilirubinemia* are based on measurement of total and direct bilirubin concentrations. *Primary hereditary hemochromatosis* is an autosomal, recessive disorder where the iron is absorbed in larger quantities and deposited in parenchymal organs. The initial evaluation of hemochromatosis is grounded on verified higher saturation of transferrin (>45%) and unsaturated capacity of iron binding (<28  $\mu$ mol/L). Genetic analysis is needed for definite diagnosis. *Wilson's disease* is hereditary disorder of copper metabolism characterized by deposition of toxic copper concentrations in tissues and organs. The most common diagnostic finding is low level of blood ceruloplasmin (< 0.17 g/L), higher concentration of free serum copper (>7  $\mu$ mol/L), lower concentration of total copper, increased copper excretion via urine (up to 20  $\mu$ mol/24h) and higher concentration of copper in liver tissue.  *$\alpha_1$ AT deficit* is an autosomal, recessive disorder with significantly lower  $\alpha_1$ -antitripsin values, giving rise to pulmonary emphysema, chronic liver diseases, cirrhosis and hepatocellular cancer. For making a diagnosis, it is necessary to measure serum  $\alpha_1$ AT concentration, phenotyping and genotyping. Reye's syndrome is a disease defined as acute, non-inflammatory encephalopathy associated with fat degeneration of the liver, with unknown etiology, and followed by general mitochondrial dysfunction. Differential diagnosis is necessary to rule out congenital metabolic defects, and determination of aminotransferases, glucose, PT, ammonia and free fat acids along with liver biopsy are crucial for verification of diagnosis. *Autoimmune hepatic diseases* include: autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.

Differential diagnosis involves the following measurements: anti-nuclear At, smooth muscle At, At to hepatic-renal-microsomal Ag, At to soluble-hepatic Ag, anti-mitochondrial At and perinuclear anti-neutrophil-cytoplasmic At, as well as utilization of endoscopic retrograde cholangiopancreatography.

*Key words:* chronic liver diseases, viral hepatitis, alcoholic hepatitis, cirrhosis, NASH, hepatocellular cancer, metabolic liver diseases, hemochromatosis, Wilson's diseases, alpha-1-antitrypsin deficiency, Reye's syndrome, autoimmune liver diseases

## Literatura

- Ravel R. Liver and biliary tract tests. *Clinical Laboratory Medicine*. Mosby-Year Book, Inc, 1995; 309–30.
- Čepelak I, štraus B, Dodig S, Labar B. Bolesti hepatobilijarnoga trakta. *Medicinsko-biokemijske smjernice*. Medicinska naklada, Zagreb, 2004; 19–47.
- Fody PE. Liver function. In: Bishop LM, Fody PE, Schoeff L. *Clinical Chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, London, New York, 2005; 475–92.
- Topić E. Bolesti jetre. U: Topić E, Primorac D, Janković S. *Medicinskobiokemijska u kliničkoj praksi*. Medicinska naklada, Zagreb, 2004; 40–60.
- Majkić-Singh N. Funkcija jetre. *Medicinska biohemija*. Društvo medicinskih biohemičara Jugoslavije, Beograd, 1994; 580–618.
- Glišić LJ. Bolesti jetre. Dijagnostika i terapija gastrointestinalnih, hepatobilijarnih i pankreasnih oboljenja. *Javno preduzeće Službeni list SRJ*, Beograd, 1998; 411–38.
- Dufour RD, Lott AJ, Nolte SF, Gretch RD, Koff SR, Seeff BL. *National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: Laboratory Guidelines for Screening, Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury*, 2000; 26–48.
- Dufour RD, Lott AJ, Nolte SF, Gretch RD, Koff SR, Seeff BL. *Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests*. *Clin Chem* 2000; 46 (12): 2027–49.
- Dufour RD, Lott AJ, Nolte SF, Gretch RD, Koff SR, Seeff BL. *Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. II. Recommendations for Use of Laboratory Tests in Screening, Diagnosis, and Monitoring*. *Clin Chem* 2000; 46 (12): 2050–68.
- Majkić-Singh N. Enzimi kod oboljenja jetre. *Klinička enzimologija*. AID Praktikum, Beograd, 1993; 255–96.
- Collier DJ, Ninkovic M, Compston JE. Guidelines on the management of osteoporosis associated with chronic liver disease. *Gut* 2002; 50 (suppl 1): 1–9.
- Tredger JM. Toxigenetic markers of liver dysfunction. In: Trull KA, Demers ML, et al. *Biomarkers of Disease*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002; 190–8.
- McGarry JD. Lipid Metabolism: Utilization and storage of energy in lipid form. In: Devlin MT. *Textbook of Biochemistry*. Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1992; 387–417.
- Larsen DS, Franzmann M, Andersen BI et al. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Liver* 2003; 53: 750–5.
- Scouller K, Conigrave MK, Macaskill P, Irwig L, et al. Should we use carbohydrate-deficient transferrin instead of c-glutamyltransferase for detecting problem drinkers? A systematic review and metaanalysis. *Clin Chem* 2000; 46 (12): 1894–902.
- Mundle G, Ackermann K, Munkes J, et al. Influence of age, alcohol consumption and abstinence on the sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin, c-glutamyltransferase and mean corpuscular volume. *Alcohol and Alcoholism* 1999; 34: 760–6.
- Golka K, Wiese A. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)—a biomarker for long-term alcohol consumption. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2004; 7(4): 319–37.
- McFarlane I, Bomford A, Sherwood R. *Liver Disease and Laboratory Medicine*. ACB Venture Publications, London, 2000; 41–145.
- Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Messous D, et al. Biomarkers as non-invasive assessment of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 19: S236–S45.
- Tsukamoto T, Yamamoto T, Ikebe T, Takemura S. Serum markers of liver fibrosis and histologic severity of fibrosis in resected liver. *Hepatogastroenterology* 2004; 51 (57): 777–80.
- Leroy V, Monier F, Bottari S. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004; 99 (2): 271–9.
- Halfon P, Ouzan D, Cattan L, Cacoub P. The prognostic tools of hepatitis C virus infections. *Presse Med* 2004; 33 (8): 542–3.
- Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: prospective study. *The Lancet* 2001; 357: 1069–75.
- Lichtinghagen R, Bahr MJ. Noninvasive diagnosis of fibrosis in chronic liver disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4 (5): 715–26.

25. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127(6): 1704–13.
26. Poynard T. Alternatives to liver biopsy for assessing liver disease status in patients with hepatitis C. *Clinical Virology and Infectious Disease* 2004; 1–6.
27. Fortunato G, Castaldo G, Oriani G, et al. Multivariate discriminant function based on six biochemical markers in blood can predict the cirrhotic evolution of chronic hepatitis. *Clin Chem* 2001; 46 (9): 1696–700.
28. Cadranel FJ, Mathurin P. Prothrombin index decrease: a useful and reliable marker of extensive fibrosis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 12 (10): 1057–59.
29. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128 (2): 343–50.
30. Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Messous D, Myers RP, Thabut D, Ratzu V, Mercadier A, Benhamou Y, Hainque B. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comp Hepatol* 2004; 3 (1): 1–12.
31. Gotoh M, Nakatani T, Masuda T, et al. Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to a-Fetoprotein and c-des carboxy-prothrombin. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 522–6.
32. Cheema AW, Hirschtritt T, Van Thiel DH. Markedly elevated alpha-fetoprotein levels without hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004; 51 (60): 1676–88.
33. Hu KQ, Kyulo NL, Lim N, Elhazin B, Hillebrand DJ. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2004; 99 (5): 860–5.
34. Gupta S, Bent S, Kohlewes J. Test Characteristics of a-Fetoprotein for detecting hepatocellular Carcinoma in patients with Hepatitis C Review. *Annals of Internal Medicine* 2003; 139: 46–50.
35. Paradis V, Degos F, Dargere D. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41 (1): 40–7.
36. Ishii M, Gama H, Chida N, Ueno Y, Shinzawa H. Simultaneous measurements of serum alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95 (4): 1036–40.
37. Amarapurkar DN, Patel ND. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop Gastroenterol* 2004; 25 (3): 130–4.
38. Sakugawa H, Nakayoshi T, Kobashigawa K, Yamashiro T Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (2): 255–9.
39. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (4): 850–5.
40. Cadet E, Perez AS, Capron D, Rochette J. Molecular basis in hereditary haemochromatosis. *Rev Med Interne* 2005; 26 (5): 393–402.
41. Schilsky ML. Wilson disease: new insights into pathogenesis, diagnosis, and future therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7 (1): 26–31.
42. Olesiejuk R, Danielak-Rybka K, Wojnarowicz-Dmitruk B. Emphysema connected with Alpha-1 anti-trypsin deficiency. *Pneumonol Alergol Pol* 2003; 71 (7–8): 344–8.
43. Larsen SU. Reye's syndrome. *Med Sci Law* 1997; 37 (3): 235–41.
44. Chang PF, Huang SF, Hwu WL, Hou JW. Metabolic disorders mimicking Reye's syndrome. *J Formos Med Assoc* 2000; 99 (4): 295–9.
45. Belay DE, Bresse SJ, Holman CR, et al. Reye's syndrome in the US from 1981–1997. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340 (18): 1377–82.
46. Ogburn LP, Sharp H, Lloyd-Still DJ, et al. Abnormal polyunsaturated fatty acid patterns of serum lipids in Reye's syndrome. *Medical Sciences* 1982; 79: 908–11.
47. Treichel U. Autoantibodies in chronic hepatitis. In: Thomas L ed. *Clinical laboratory diagnostics*. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges., 1998; 834–840.
48. Luxon BA. Autoimmune hepatitis. Making sense of all those antibodies. *Postgrad Med* 2003; 114 (1): 79–82.
49. Rigopoulou EI, Davies ET, Pares A, Zachou K. Prevalence and clinical significance of isotype specific anti-nuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 2005; 54 (4): 528–32.
50. Yang WH, Yu JH, Nakajima A, Neuberg D, Lindor K Do antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis patients identify increased risk for liver failure? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2 (12): 1116–22.

*Rad primljen: 15. 05. 2005.*

*Prihvaćen za štampu: 25. 05. 2005.*