

Povezanost polimorfizama gena PNPLA3, NOTCH3 i EGF s pojavom hepatocelularnoga karcinoma u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre

Bainrauch, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:076771>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-09**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Bainrauch

**Povezanost polimorfizama gena *PNPLA3*,
NOTCH3 i *EGF* s pojavom
hepatocelularnoga karcinoma u
bolesnika s alkoholnom cirozom jetre**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Bainrauch

**Povezanost polimorfizama gena *PNPLA3*,
NOTCH3 i *EGF* s pojavom
hepatocelularnoga karcinoma u
bolesnika s alkoholnom cirozom jetre**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur i Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga.

Izrada ove disertacije omogućena je sredstvima iz projekta Hrvatske zaklade za znanost „Uloga Notch signalnog puta u patogenezi jetrene fibroze“ (HRZZ-UIP-1965; voditelj izv. prof. dr. sc. Tomislav Kelava) i donacijama HEP-a „Svjetlo na zajedničkom putu“ (2019. i 2020.god.).

Voditelji rada:

izv. prof. dr. sc. Anna Mrzljak

izv. prof. dr. sc. Tomislav Kelava

ZAHVALA:

Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Anni Mrzljak i prof. dr. sc. Tomislavu Kelavi na savjetima, pomoći, strpljenju i poticaju tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem suprugu Ivanu i kćerima Luciji i Juditi koji su mi pružili neizmjernu količinu snage, podrške, ljubavi i razumijevanja na ovom putu.

Zahvaljujem svojim roditeljima, sestrama i bratu koji su mi uvijek bili velika potpora.

Zahvaljujem kolegama dr. sc. Ani Ostojić, dr. sc. Dini Šislu i dr. Ivanu Budimiru Bekanu koji su uvijek bili spremni pomoći pri izradi disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija alkoholne bolesti jetre i hepatocelularnoga karcinoma.....	1
1.2. Alkoholna bolest jetre.....	2
1.2.1. Alkohol i karcinogeneza.....	4
1.3. Alkoholna ciroza i hepatocelularni karcinom.....	5
1.3.1. Patogeneza fibroze i ciroze jetre.....	6
1.3.2. Patogeneza hepatocelularnoga karcinoma.....	7
1.3.3. Dijagnoza hepatocelularnoga karcinoma.....	8
1.4. Genetski čimbenici rizika za pojavu hepatocelularnoga karcinoma u alkoholnoj bolesti jetre.....	10
1.4.1. PNPLA3.....	13
1.4.2. EGF.....	16
1.4.3. Notch signalni put.....	19
1.4.4. Notch signalni put u bolestima jetre.....	21
2. HIPOTEZA.....	24
3. CILJEVI RADA.....	25
3.1. Opći cilj.....	25
3.2. Specifični ciljevi.....	25
4. MATERIJALI I METODE.....	26
4.1. Ispitanici.....	26
4.2. Kemikalije i uređaji.....	27
4.3. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline.....	28
4.4. Određivanje jednonukleotidnih polimorfizama gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze.....	29

4.5. Statistička analiza.....	35
5. REZULTATI.....	36
5.1. Demografska obilježja, laboratorijski i patološki nalazi pacijenata uključenih u istraživanje.....	36
5.2. Analiza učestalosti polimorfizma gena <i>PNPLA3</i> rs738409.....	40
5.2.1. Povezanost polimorfizma gena <i>PNPLA3</i> rs738409 s rizikom za hepatocelularni karcinom u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, overdominantnom i log-aditivnom modelu.....	41
5.2.2. Analiza povezanosti polimorfizma gena <i>PNPLA3</i> rs738409 s kliničkim nalazima pacijenata.....	43
5.3. Analiza učestalosti polimorfizma gena <i>EGF</i> rs4444903.....	45
5.3.1. Povezanost polimorfizma gena <i>EGF</i> rs4444903 s rizikom za hepatocelularni karcinom u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, overdominantnom i log-aditivnom modelu.....	47
5.3.2. Analiza povezanosti polimorfizma gena <i>EGF</i> rs4444903 s kliničkim nalazima pacijenata.....	49
5.4. Analiza učestalosti polimorfizma gena <i>NOTCH3</i> rs1043996.....	51
5.4.1. Povezanost polimorfizma gena <i>NOTCH3</i> rs1043996 s rizikom za hepatocelularni karcinom u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, overdominantnom i log-aditivnom modelu.....	52
5.4.2. Analiza povezanosti polimorfizma gena <i>NOTCH3</i> rs1043996 s kliničkim nalazima pacijenata.....	54
5.5. Analiza neravnoteže vezanosti gena i analiza logističkom regresijom za procjenu neovisnosti pojedinih polimorfizama.....	56
5.6. Analiza utjecaja polimorfizama primateljevih gena <i>PNPLA3</i> , <i>EGF</i> i <i>NOTCH3</i> na preživljenje bez recidiva hepatocelularnoga karcinoma.....	58

6. RASPRAVA.....	60
7. ZAKLJUČCI.....	67
8. SAŽETAK.....	68
9. SUMMARY.....	69
10. POPIS LITERATURE.....	70
11. ŽIVOTOPIS.....	83

Popis oznaka i kratica

ADAMs – disintegrin i metaloproteinaze (engl. *a disintegrin and metalloproteinase*)

AFP – alfa-fetoprotein

ALD – alkoholna bolest jetre

AUD – poremećaj uporabe alkohola (engl. *alcohol use disorder*)

BCLC – Barcelona klinički kriteriji za određivanje stadija tumora jetre (engl. *The Barcelona Clinic Liver Cancer staging system*)

DAMPs – molekularni uzorci povezani s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*)

DLL – Delta-sličan ligand

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ECM – izvanstanični matriks

EGF – epidermalni faktor rasta

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija

GRS – skor za procjenu genetskog rizika (engl. *genetic risk score*)

GWAS – studija asocijacije na razini genoma (engl. *genome-wide associated study*)

HBV – hepatitis B virus

HCC – hepatocelularni karcinom

HCV – hepatitis C virus

HSC – jetrena zvjezdolika stanica (engl. *hepatic stellate cell*)

IL – interleukin

IQR – interkvartilni raspon

JAG – Jagged

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*)

NEXT – skraćeni izvanstanični Notch (engl. *Notch extracellular truncation*)

NICD – Notch unutarstanična domena (engl. *Notch intracellular domain*)

NRR – negativna regulatorna regija

PCR – lančana reakcija polimeraze

PNPLA3 – protein 3 koji sadrži domenu fosfolipaze u obliku patatina (engl. *Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3*)

PRS – rezultati poligenog rizika (engl. *polygenic risk score*)

ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

RTK – receptori tirozin kinaza

SAD – Sjedinjene Američke Države

SD – standardna devijacija

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

TERT – reverzna transkriptaza telomeraze

TGF β – transformirajući faktor rasta β

TNF α – tumor nekrotizirajući faktor α

TP53 – tumor supresorski gen p53

UCSF – San Francisco kriteriji (engl. *the University of California San Francisco*)

UZV – ultrazvuk

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

VLDL – lipoproteini vrlo niske gustoće

1. UVOD

1.1. Epidemiologija alkoholne bolesti jetre i hepatocelularnoga karcinoma

Hepatocelularni karcinom (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) najčešći je primarni tumor jetre koji čini oko 90% svih primarnih tumora, a nastaje na podlozi preegzistentne kronične bolesti jetre (1). Incidencija HCC-a posljednjih je godina u porastu stoga je HCC peti najčešći karcinom dok se prema mortalitetu od malignih bolesti nalazi na drugom mjestu (2, 3). U razdoblju od 1990. do 2019. godine zabilježen je 70% porast incidencije HCC-a koji je odgovoran za nešto manje od 500000 smrtnih slučajeva godišnje u svijetu (4). Češće se javlja kod muškaraca te su incidencija i mortalitet od HCC-a 2 do 3 puta veći kod muškaraca nego kod žena (5).

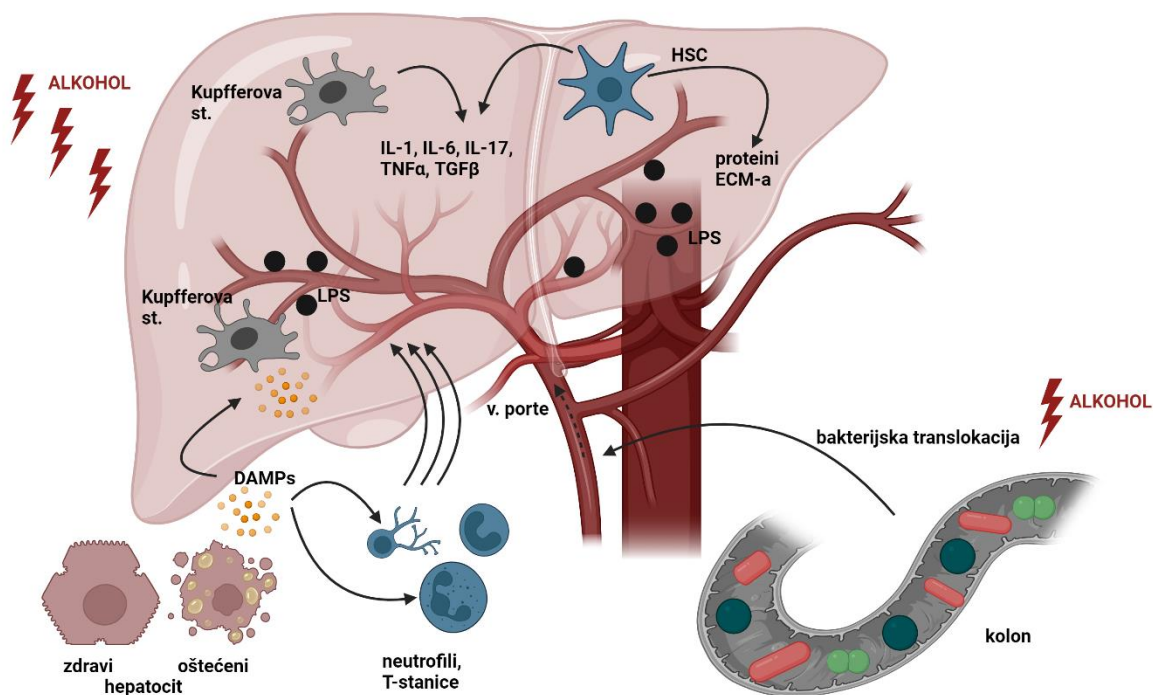
Alkoholna bolest jetre (engl. *alcoholic liver disease*, ALD) jedna je od vodećih rizičnih čimbenika na čijoj podlozi nastaje 20-30% ukupnog broja HCC-a (6). S progresijom ALD-a prema cirozi povećava se rizik za razvoj komplikacija same jetrene bolesti ali i HCC-a. Godišnja stopa HCC-a na podlozi alkoholne ciroze stadija Child Pugh A ili B iznosi 2,5% (7). S trajanjem bolesti povećava se i kumulativna incidencija za pojavu HCC-a koja u 1-godišnjem, 5-godišnjem i 10-godišnjem intervalu iznosi 1%, 3% i 9% (8). Iako je ALD vodeći uzrok kroničnih jetrenih bolesti u Europi, Sjevernoj i Latinskoj Americi, unutar Europe postoje značajne varijacije u navikama vezanim uz konzumaciju alkohola što rezultira i različitom učestalošću HCC-a u pojedinim regijama (9). Tako je alkohol odgovoran za nastanak 20% HCC-a u južno-europskim zemljama odnosno 63% HCC-a u istočno-europskim zemljama (6).

Prema zadnjim dostupnim podacima, u Republici Hrvatskoj su 2020. godine dijagnosticirana 523 nova slučaja karcinoma jetre i intrahepatalnih žučnih vodova no nisu dostupni podaci o točnom broju novodijagnosticiranih HCC-a (10). Ipak, na temelju zastupljenosti HCC-a možemo zaključiti da je taj broj nešto veći od 400 godišnje. U skladu s podacima za europske zemlje, i u Hrvatskoj je ALD jedan od vodećih uzroka ciroze i HCC-a što ju čini važnim javnozdravstvenim problemom. S obzirom da ne postoje podaci o broju pacijenata koji se liječe radi ALD-a nije poznato niti koliki je udio pacijenata s alkoholnom cirozom i HCC-om.

1.2. Alkoholna bolest jetre

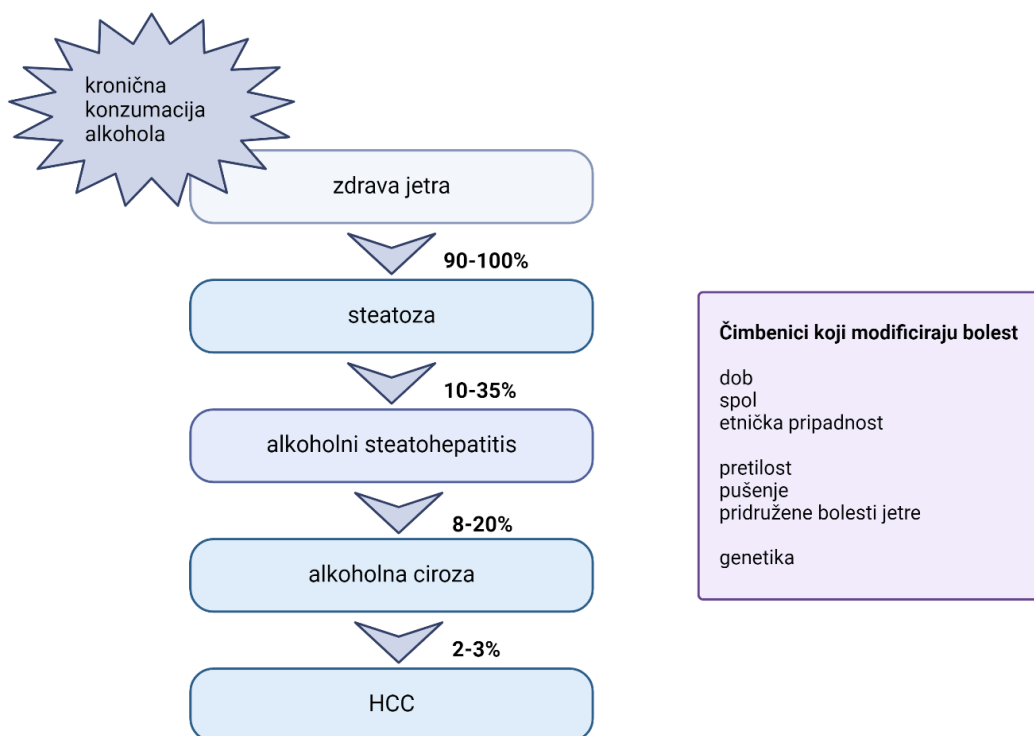
Alkoholna bolest jetre entitet je koji uključuje steatozu, alkoholni steatohepatitis, fibrozu i cirozu jetre i jedan je od vodećih uzroka kroničnih bolesti jetre u svijetu. Prekomjerna konzumacija etilnog alkohola izolirani je ili pridruženi čimbenik rizika i u do 50% svih ciroza te je odgovorna za oko 27% smrti uzrokovanih jetrenim bolestima i 30% smrti uzrokovanih karcinomima jetre (11, 12).

Oštećenje jetre alkoholom prvo se očituje masnom jetrom odnosno steatozom koja je posljedica djelovanja alkohola na metabolizam masti pri čemu je povećana sinteza masnih kiselina i smanjena njihova β -oksidacija (13). Daljnja izloženost toksičnom djelovanju alkohola uzrokuje oksidativni stres i oštećenje hepatocita iz kojih se oslobađaju DAMP-ovi (engl. *damage-associated molecular patterns*) koji dalje utječu na proizvodnju proupalnih citokina i lokalizaciju imunoloških stanica na mjestu oštećenja (14). Alkohol povećava permeabilnost crijeva što omogućuje translokaciju bakterijskih produkata kao što je lipopolisaharid koji u Kupfferovim stanicama pokreće signalne puteve odgovorne za stvaranje proupalnih citokina i oštećenje hepatocita (15). Aktivirane Kupfferove stanice otpuštaju proupalne citokine IL-1, IL-17, TNF α (engl. *tumor necrosis factor α*) i TGF β (engl. *transforming growth factor β*) (13). Alkohol aktivira i sistem komplementa koji u interakciji s proupalnim citokinima i Kupfferovim stanicama utječe na stvaranje kemokina i privlačenje neutrofila te aktivaciju zvjezdolikih stanica u jetri (engl. *hepatic stellate cell*, HSC) (16, 17). Upalni infiltrat kojeg čine neutrofili, makrofazi, aktivirane Kupfferove stanice i imunološke stanice ključni je čimbenik koji pokreće progresiju ALD-a prema steatohepatitisu, cirozi i HCC-u (18). U daljnjem tijeku, kronična izloženost alkoholu uzrokuje oštećenje hepatocita koje podržava upalni odgovor i aktivaciju HSC-a odgovornih za stvaranje kolagena i ostalih proteina izvanstaničnog matriksa te razvoj fibroze (13).



Slika 1. Patogeneza alkoholne bolesti jetre. Iz oštećenih hepatocita oslobađaju se DAMP-ovi koji lokaliziraju imunološke stanice na mjestu oštećenja. Povećana permeabilnost crijeva uzrokuje bakterijsku translokaciju pri čemu LPS potiče stvaranje proupalnih citokina u Kupfferovim stanicama. Aktivirane Kupfferove stanice otpuštaju proupalne citokine i kemokine koji privlače neutrofile, potiču stvaranje upalnog infiltrata te aktiviraju HSC-e odgovorne za stvaranje ECM-a. DAMP – molekularni uzorci povezani s oštećenjem, ECM – izvanstanični matriks, HSC – zvjezdolike stanice jetre, LPS – lipopolisaharid. Shema kreirana u BioRender.com.

Nastanak ALD-a povezuje se s redovitom konzumacijom alkohola u dozama većim od 20 g/dan za žene i 30 g/dan za muškarce uz znakove oštećenja jetrene funkcije (19). Tijek bolesti takav je da gotovo svi pacijenti, njih 90-100%, razviju steatozu dok tek manji udio pacijenata, njih 10-35%, progrediraju u alkoholni steatohepatitis odnosno 10-20% koji nastavljaju daljnju progresiju u alkoholnu cirozu (Slika 2.) (20). Razvoj ciroze dugotrajan je proces povezan s konzumacijom velikih količina alkohola kroz period od 10 do 20 godina (14, 21). Uz trajanje ciroze, važnu ulogu ima i količina konzumiranog alkohola, stoga kronična konzumacija više od 80 g/dan više od 10 godina peterostruko povećava rizik za HCC (22).



Slika 2. Tijek alkoholne bolesti jetre. Shema kreirana u BioRender.com.

1.2.1. Alkohol i karcinogeneza

Acetaldehid koji nastaje metabolizmom alkohola ima kancerogeno djelovanje u ljudskim stanicama (23). U tumorskom tkivu aktivnost alkohol dehidrogenaze veća je nego aktivnost aldehid dehidrogenaze čime je smanjena mogućnost uklanjanja acetaldehida (24). Acetaldehid kao karcinogen interferira u procesima sinteze i popravaka deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNK), a njegovim vezanjem za DNK stvaraju se brojni DNK-adikti koji doprinose karcinogenezi (25, 26). Dugotrajna konzumacija alkohola inducira oksidativni metabolizam alkohola putem CYP2E1 što uzrokuje oksidativni stres, stvaranje reaktivnih vrsta kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i lipidnu peroksidaciju pri čemu nastaju DNK-adikti koji uzrokuju mutacije gena odgovornih za regulaciju staničnog ciklusa i supresiju tumora (27). ROS djeluju na unutarstanične signalne putove odgovorne za transformaciju normalnih stanica u tumorske te na signalne puteve koji promiču stvaranje metastaza (28). Etanol inhibira sintezu S-adenozil-l-metionina odgovornog za metilaciju DNK te dolazi do hipometilacije koja doprinosi pojačanoj ekspresiji onkogenih odgovornih za nastanak HCC-a (25, 29).

1.3. Alkoholna ciroza i hepatocelularni karcinom

Jednom nastala ciroza glavni je rizični čimbenik za razvoj HCC-a budući da gotovo 90% HCC-a nastaje na podlozi uznapredovale fibroze i ciroze jetre dok se alkohol nije pokazao kao rizični čimbenik za HCC u jetri bez fibroze (6). Uz alkohol, rizični čimbenici za razvoj HCC-a su: starija životna dob, muški spol, pretilost, količina i obrazac konzumacije te duljina izloženosti alkoholu i genetski čimbenici (30). HCC je glavni uzrok smrti povezane s jetrenom bolešću kod pacijenata s kompenziranom cirozom (31). S druge strane, svaka godina apstinencije od alkohola smanjuje rizik za HCC za 6-7% (4).

Istraživanje u francuskoj populaciji pacijenata s HCC-om pokazalo je da više od 50% pacijenata u vrijeme dijagnoze HCC-a ima neprepoznatu cirozu jetre u podlozi, dok je podanaliza pokazala da je taj udio još i veći te da se neprepoznata ciroza nalazi u 81% pacijenata s alkoholom uzrokovanim HCC-om odnosno u 42% slučajeva HCC-a koji uz alkohol imaju i metaboličku bolest jetre (32). Drugo istraživanje na istoj populaciji pokazalo je da oni s alkoholom uzrokovanim HCC-om imaju lošije ukupno preživljenje u odnosu na one s ne-alkoholnim HCC-om što je posljedica lošije jetrene funkcije i karakteristika samog tumora (33). Slične rezultate pokazalo je i istraživanje talijanskih autora koji su uspoređivali HCC na podlozi ALD-a i hepatitis C infekcije te su zaključili da se alkoholom uzrokovan HCC češće otkriva izvan programa probira, u uznapredovaloj fazi jetrene bolesti kao i u kasnijem stadiju tumora što je povezano s lošijim preživljenjem (34). Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da postoje određeni izazovi u prepoznavanju pacijenata s alkoholnom cirozom i njihovim praćenjem te ranim otkrivanjem HCC-a što je povezano s lošijim ishodom. S druge strane, pacijenti s alkoholom uzrokovanim HCC-om češće su bili muškarci mlađe životne dobi uz pridružene komorbiditete: pušenje, pretilost, dijabetes, metaboličku bolest jetre koji djeluju kao pridruženi čimbenici za nastanak HCC-a (34, 35, 36). Uz sve navedene čimbenike, na razvoj ALD-a te progresiju prema cirozi i nastanku HCC-a utječu i brojni genetski čimbenici među kojima su najznačajniji polimorfizmi gena *PNPLA3* (engl. *Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3*), *EGF* (engl. *epidermal growth factor*) i *TM6SF2* (engl. *transmembrane 6 superfamily member 2*) (37). Prisutnost ovih čimbenika doprinosi bržoj progresiji jetrene bolesti i nastanku tumora. Prognoza HCC-a neovisna je o etiologiji jetrene ciroze no njegovo kasno otkrivanje i uznapredovala ciroza ograničavajući su čimbenici za uspješno liječenje (6). Kašnjenje u dijagnozi HCC-a u alkoholnoj cirozi povezano je s insuficijentnim programima probira, nedostatkom medicinskih programa za liječenje ovisnosti o alkoholu te socijalno i društveno uvjetovanom stigmatizacijom pacijenata (38). Pacijenti s neprepoznatom cirozom

imaju 6,5 puta veći omjer izgleda za pojavu HCC-a u uznapredovalom stadiju u odnosu na pacijente s prepoznatom cirozom (39). Budući da je ciroza glavni pojedinačni rizični čimbenik za nastanak HCC-a, za sve pacijente s cirozom jetre preporuča se uključivanje u program probira na HCC koji se sastoji od ultrazvučnog (UZV) pregleda u 6-mjesečnim intervalima koji može biti kombiniran s određivanjem tumorskog markera alfa-fetoproteina (AFP) iz seruma (1, 2). Čak i uz preporučene programe probira, 20-30% HCC-a u cirozi ostaje neprepoznato u ranoj fazi (40). Švedska studija pokazala je da su pacijenti uključeni u program probira češće dijagnosticirani u ranijim stadijima HCC-a kada su bili kandidati za kurativno liječenje te su imali značajno duže procijenjeno vrijeme preživljenja (41).

1.3.1. Patogeneza fibroze i ciroze jetre

Fibroza jetre reverzibilan je proces koji je odgovor na kronično oštećenje jetre uzrokovano alkoholom ili nekim drugim toksičnim čimbenikom, a koji karakterizira pojačano nakupljanje izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) (42, 43). Ključnu ulogu u tom procesu imaju HSC-e (44). Za ALD karakteristično je nakupljanje ECM-a i razvoj fibroze pericelularno i perisinusoidalno (45). Razvoj fibroze dinamičan je proces koji započinje transformacijom mezenhimalnih stanica u miofibroblaste čija je aktivacija i proliferacija glavni izvor ECM-a (43). Miofibroblasti primarno nastaju iz HSC-a koje se u zdravoj jetri nalaze inaktivne u Disse-ovim prostorima i sadrže lipidne kapljice u kojima je pohranjen vitamin A (44). Prilikom oštećenja jetre dolazi do otpuštanja tih lipidnih kapljica i vitamina A te aktivacije HSC-a koje stvaraju ECM (kolagen tip I, III i IV, fibronektin, laminin i proteoglikane), proupalne medijatore, faktore rasta i eksprimiraju fibrogene markere: α -glatkomišićni aktin (engl. *α -Smooth Muscle Actin*, α -SMA) i tkivni inhibitor metaloproteinaze 1 (engl. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1*, TIMP1) (42, 44, 46). Osim HSC-a, fibroblasti u portalnim prostorima, stanice iz koštane srži te epitelne stanice mogu se transformirati u miofibroblaste (47). Aktivacija HSC-a uzrokovana je direktnim oštećenjem hepatocita pri čemu se oslobađaju ROS i fibrogeni medijatori te posredstvom citokina koje luče imunološke stanice, Kupfferove stanice i Th17 stanice (44, 48). Kupfferove stanice secerniraju IL-1, TNF α , kemokine ligande 2 i 5 (engl. *chemokine ligand*, CCL) koji uz aktivaciju HSC-a potiču regurgitaciju proinflamatornih stanica što doprinosi stvaranju fibroze (42). TGF β jedan je od najpotentnijih profibrogenih citokina odgovoran za transformaciju HSC-a u miofibroblaste koji stvaraju ECM sastavljen od kolagena I i III te fibronektina dok je u zdravoj jetri sastavljen od kolagena IV i

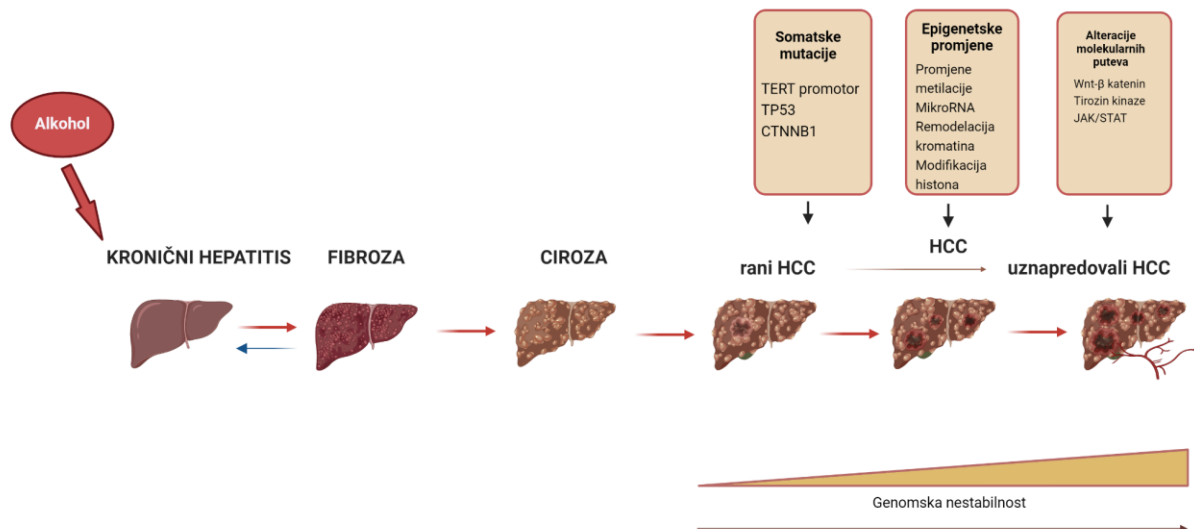
VI (43, 49). Progresivno oštećenje jetre dovodi do promjena na sinusoidalnim epitelnim stanicama koje gube fenestracije, dolazi do revaskularizacije i aktivacije HSC-a te sekrecije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) što potiče angiogenezu koja dalje ima ulogu u karcinogenezi (43, 44, 45, 50). Stvaranje ECM-a promijenjenog sastava utječe na niz signalnih puteva pri čemu dolazi do aktivacije faktora rasta uključujući i TGF β te pospješuje epitelno-mezenhimalnu tranziciju (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) što ima ključnu ulogu u malignoj transformaciji epitelnih stanica i nastanku karcinoma (51).

Progresija fibroze i razvoj ciroze očituje se promjenom jetrene i krvožilne arhitekture s formiranjem jetrenih nodula okruženih fibroznim septama. Fibrozne promjene u portalnim prostorima rezultiraju venskim okluzijama, formiranjem porto-sistemskih shuntova te razvojem portalne hipertenzije.

1.3.2. Patogeneza hepatocelularnoga karcinoma

Hepatociti u displastičnim nodulima izloženi su dugotrajnom upalnom zbivanju te su fenotipski promijenjeni i podložni genetskim i epigenetskim promjenama koje uključuju mutacije reverzne transkriptaze telomeraze (engl. *telomerase reverse transcriptase*, TERT) promotora, kromosomske aberacije i metilacijske događaje čime započinje njihova maligna transformacija (52, 53). TERT mutacija jedna je od najčešćih somatskih mutacija; odgovorna za regulaciju duljine telomere i ključni je pokretač karcinogeneze koja se nalazi se u 60-80% HCC-a (54, 55). Uz navedene TERT mutacije, u pokretače karcinogeneze ubrajaju se još mutacije tumor supresorskog gena p53 (engl. *tumor suppressor p53*, TP53) i CTNNB1 koje se nalaze u oko 51% malih HCC-a (55). Mutacije TP53 utječu na regulaciju staničnog ciklusa i popravak DNK, a nalaze se u 15-40% HCC-a ovisno o etiologiji jetrene bolesti (56). Gubitkom funkcije tumor supresora, mutacije TP53 poprimaju onkogenu funkciju povezanu s karcinogenezom, razvojem rezistencije na kemoterapeutike i lošijom prognozom (57). CTNNB1 mutacija za β -katenin dovodi do poremećaja signalnog puta Wnt/ β -katenin i nalazi se u 30-50% HCC-a (55). Wnt/ β -katenin signalni put odgovoran je za obnovu, diferencijaciju i proliferaciju tumorskih matičnih stanica. Poremećaji u transkripciji β -katenina kao ključne komponente ovog signalnog puta odgovorni su za pokretanje rane karcinogeneze (58). Uz ove navedene, epigenetske modifikacije, oksidativni stres i signalni putevi odgovorni za rast (IGF, EGF, FGF, PDGF) i diferencijaciju stanica (Wnt/ β -katenin, JAK/STAT, Notch) te putevi ovisni o tirozin kinazama

(PI3-K/AKT/MTOR i RAS/RAF) čine glavne mehanizme koji su mutirani i odgovorni za nastanak HCC-a (56, 57). Uz navedene mutacije koje pokreću karcinogenezu, polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) najčešće su genetske varijacije koje različitim mehanizmima utječu na individualnu podložnost za razvoj HCC-a (60).

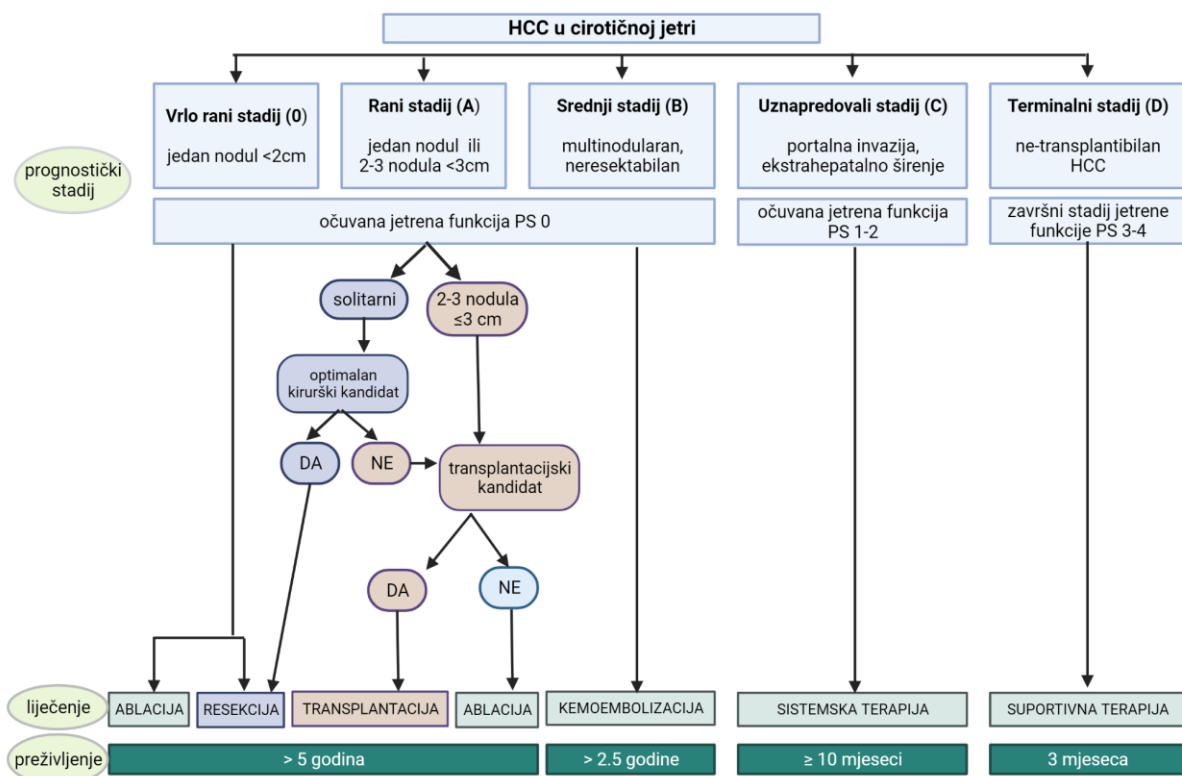


Slika 3. Čimbenici koji utječu na razvoj i progresiju HCC-a. Progresija fibroze i razvoj ciroze mijenjaju jetrenu arhitekturu formirajući displastične nodule koji pod utjecajem genetskih i epigenetskih promjena maligno transformiraju. Shema kreirana u BioRender.com.

1.3.3. Dijagnoza hepatocelularnoga karcinoma

Ukoliko se UZV-om verificira nodul ≥ 1 cm u cirotičnoj jetri, daljnja dijagnoza HCC-a postavlja se prvenstveno morfološkim kontrastnim metodama: višeslojnom kompjutoriziranom tomografijom (engl. *multislice computed tomography*, MSCT) i/ili magnetskom rezonancom (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) dok je biopsija jetre indicirana tek ukoliko su morfološke metode inkonkluzivne (1, 61). Intenzivno nakupljanje kontrasta u leziji u arterijskoj fazi te ispiranje u venskoj i/ili odgođenoj fazi karakteristično je za HCC (62). Najčešće korištena klinička klasifikacija koja uključuje stadij HCC-a kao i funkciju jetre/stadij ciroze je Barcelona klasifikacija (engl. *The Barcelona Clinic Liver Cancer staging system*, BCLC) koja temeljem veličine i broja lezija HCC-a te funkcije jetre određuje modalitet liječenja (Slika 4.) (63). Uz morfološke karakteristike, tumorski marker AFP najčešće je korišten biomarker za HCC. Ovisno o laboratoriju, granične vrijednosti za dijagnozu HCC-a su AFP 10-20 ng/mL pri

čemu je senzitivnost 40-60% (64, 65). Iako se AFP klinički često koristi u probiru rizičnih pacijenata, važno je napomenuti da čak 80-90% malih HCC-a neće imati povišene vrijednosti AFP-a kao niti 15-30% uznapredovalih HCC-a (1, 64, 65). Povišene vrijednosti AFP-a povezane su lošijom prognozom, rizikom od recidiva tumora nakon resekcije ili transplantacije, lošijim odgovorom na lokoregionalnu terapiju te lošijim ukupnim preživljenjem. HCC dijagnosticiran u vrlo ranoj (BCLC 0) i ranoj fazi (BCLC A) može se uspješno liječiti resekcijom, ablacijom ili transplantacijom jetre. HCC u stadiju BCLC 0 liječen resekcijom ima 5-godišnje preživljenje 80-90% odnosno 70% za one liječene radiofrekventnom ablacijom dok je 5-godišnje preživljenje za HCC stadija BCLC A liječenog resekcijom, transplantacijom ili ablacijom 50-70% (1). Transplantacija jetre prva je linija liječenja za rani stadij HCC-a (BCLC A) koji uključuje do 3 tumora veličine do 3 cm uz narušenu funkciju jetre ili klinički značajnu portalnu hipertenziju s gradijentom jetrenog venskog tlaka >10 mmHg (engl. *hepatic venous pressure gradient*, HVPG) te izostanak znakova ekstrahepatalne diseminacije (3). Paralelno s porastom incidencije, HCC postaje i jedna od vodećih indikacija za transplantacijsko liječenje. Samo u Europi 30-35% bolesnika na listi za transplantaciju ima HCC u cirozi jetre (1).



Slika 4. Barcelona klinička klasifikacija za određivanje stadija hepatocelularnoga karcinoma (BCLC).

HCC – hepatocelularni karcinom Shema kreirana u BioRender.com

1.4. Genetski čimbenici rizika za pojavu hepatocelularnoga karcinoma u alkoholnoj bolesti jetre

Gledajući cijeli spektar ALD-a, tek manji dio bolesnika progredira do alkoholne ciroze od kojih 2,5-2,9% godišnje razvije HCC što govori u prilog činjenici da samo prekomjerna konzumacija alkohola nije jedini niti dovoljan čimbenik rizika (66, 67). Na razvoj HCC-a utječe niz okolišnih i nasljednih čimbenika te genetske i epigenetske promjene. Koliko je značajan genetski utjecaj na razvoj spektra poremećaja uporabe alkohola (engl. *alcohol use disorder*, AUD) govore rezultati istraživanja Verhulsta i sur. koji su pokazali da je AUD u 50% slučajeva nasljedan dok su istraživanja na blizancima pokazala da je nasljednost alkoholne ciroze 21-67% te je tri puta veća među jednojajčanim blizancima (37, 68). Genetski čimbenici, uz brojne epigenetske promjene, zajedničkom interakcijom povećavaju osjetljivost pojedinca za razvoj ciroze i HCC-a. Iako je HCC jedan od vodećih malignoma, manje od 30% HCC-a u ALD-u verificira se kroz programe probira što može objasniti činjenicu da samo postojanje ciroze kao kriterij za uključivanje u probir nije dovoljno te se sve više istražuju genetski čimbenici koji bi dodatno objasnili taj rizik (6).

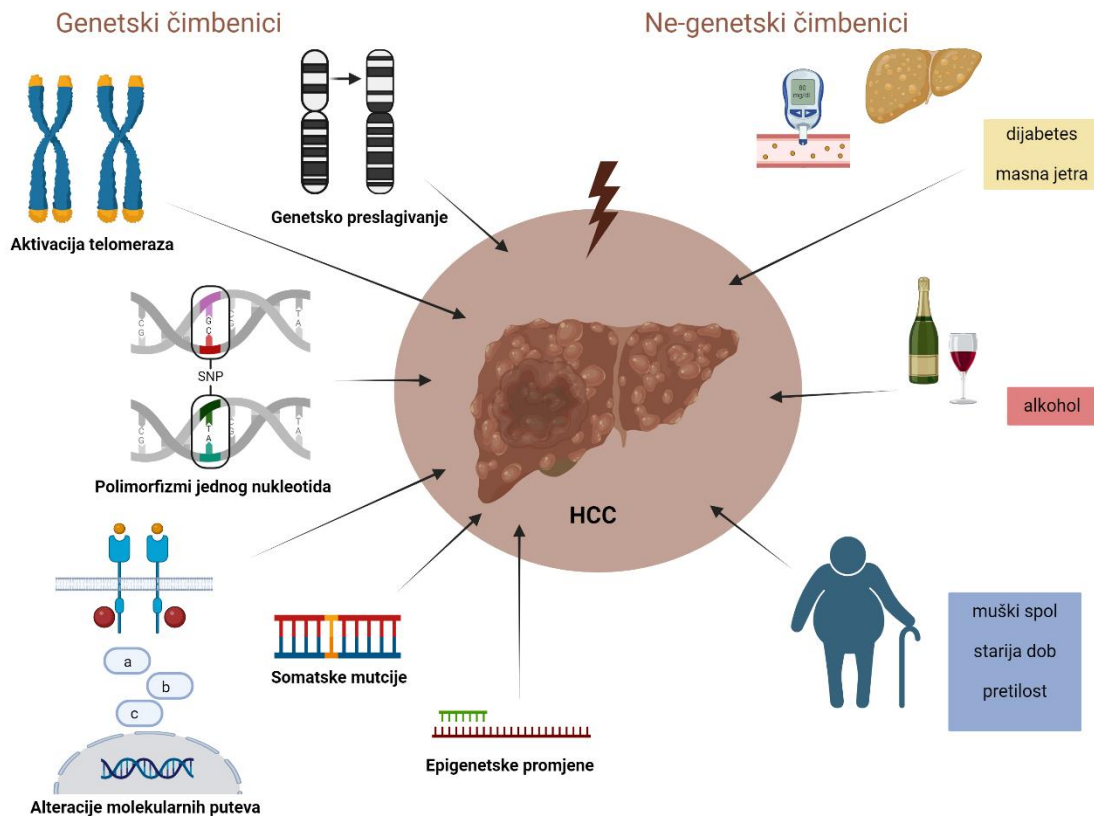
Među genetske čimbenike rizika spadaju i SNP-ovi koji su odgovorni za više od 90% alelnih nepodudarnosti u genomu (69). SNP-ovi predstavljaju zamjenu samo jedne baze koja se može nalaziti u različitim regijama gena uključujući promotorske regije, egzone, introne te 5' ili 3'-neprepisujuće regije (70). Većina SNP-ova nalazi se u nekodirajućim regijama te su funkcionalno neutralni dok neki modificiraju ekspresiju gena i funkciju čime utječu na različite biološke puteve zbog čega su SNP-ovi povezani s genetskom nasljednosti te individualnom sklonošću za razvoj HCC-a (60, 69).

Genetski čimbenici koji doprinose nastanku fibroze, jednog od ključnih mehanizama u nastanku HCC-a, povezani su i s rizikom za HCC (44). Jedan od najviše istraživanih pojedinačnih genetskih čimbenika rizika je polimorfizam gena *PNPLA3* rs738409 koji se u studiji asocijacije na razini genoma (engl. *genome-wide association study*, GWAS) pokazao kao čimbenik povezan s upalom i sadržajem masti u jetri te podložnosti za razvoj nealkoholne masne bolesti jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) (71). Daljnja istraživanja pokazala su da su polimorfizmi gena *PNPLA3*, *TM6SF2* i *MBOAT* (engl. *membrane bound O-acyl transferase*) genetski čimbenici koji modificiraju tijek bolesti u ALD-u i NAFLD-u budući da imaju isti histološki obrazac koji se očituje poremećenim metabolizmom lipida u jetri (37). Istraživanja povezanosti polimorfizma *PNPLA3* i ALD-a pokazala su da je ovaj polimorfizam

rizični čimbenik za razvoj cijelog spektra ALD-a uključujući i alkoholnu cirozu i HCC (72). Kada je istraživana njegov utjecaj na ALD u europskoj populaciji, ovaj polimorfizam pokazao se kao najjači nezavisni čimbenik rizika za razvoj alkoholne ciroze (73). *PNPLA3* nasljedni je čimbenik koji utječe na progresiju ALD-a, a osobe koje konzumiraju alkohol i nositelji su genotipa GG *PNPLA3* imaju povišen rizik za razvoj ALD-a te su podložne daljnjoj progresiji bolesti prema cirozi i HCC-u (74). Danska studija na pacijentima s prekomjernom konzumacijom alkohola pokazala je da su polimorfizmi *PNPLA3* i *TM6SF2* gena rizični čimbenici povezani s višim stupnjem fibroze te da se kombinacijom metaboličkih i genetskih čimbenika rizika može predvidjeti uznapredovala fibroza ($F \geq 3$) (75). Withfield i sur. pokazali su da bolesnici koji kronično konzumiraju velike količine alkohola imaju povećan rizik za nastanak ciroze ukoliko su nositelji polimorfizama *PNPLA3* rs738409, *SUGPI-M6SF2* rs10401969, *HSD17B13* rs6834314, a rizik se dodatno povećava ukoliko imaju pridruženu šećernu bolest (76). GWAS studija Bucha i sur. koja je uključila bolesnike s alkoholnom cirozom u Njemačkoj i Ujedinjenom Kraljevstvu potvrdila je povezanost polimorfizma *PNPLA3* s alkoholnom cirozom te identificirala dva dodatna rizična polimorfizma: *TM6SF2* i *MBOAT7* (77). Novija GWAS studija na bolesnicima europskog podrijetla s alkoholnom cirozom istaknula je da je za razvoj alkoholne ciroze uz prekomjernu konzumaciju alkohola nužno postojanje i genetskih čimbenika rizika među kojima su istaknuli polimorfizme gena *PNPLA3*, *AF2* rs374702773 (engl. *Fas Associated Factor Family Member 2*) i *SERPINA1* rs28929474 dok nisu potvrdili povezanost s polimorfizmom *MBOAT7* (78). Meta-analiza Donga i sur. pokazala je povezanost ukupno 21 SNP-ova na 19 gena s HCC-om od čega je samo jedan polimorfizam (*PNPLA3* rs738409) okarakteriziran kao snažno povezan s HCC-om dok je kod ostalih polimorfizama povezanost s HCC-om ovisila o etničkoj pripadnosti i etiologiji jetrene bolesti (79). Uz *PNPLA3*, polimorfizam *TM6SF2* pokazao se kao čimbenik koji dodatno doprinosi riziku za HCC u alkoholnoj cirozi (80). S druge strane, polimorfizam *HSD17B13* (engl. *17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13*) protektivni je čimbenik za nastanak HCC-a u ALD-u (81). Prva GWAS studija učinjena na europskoj populaciji pacijenata s HCC-om na podlozi ALD-a potvrdila je povezanost polimorfizama *PNPLA3* i *TM6SF2* gena s rizikom za HCC te je identificirala jedan novi polimorfizam – *WNT3A-WNT9A* rs708113 koji ima protektivno djelovanje (82). Polimorfizam *WNT3A-WNT9A* modulira imunološki upalni odgovor i sprječava aktivaciju β -katenina što smanjuje prevalenciju CTNNB1 mutacija koje se nalaze u 50% HCC-a uzrokovanih alkoholom. Za razliku od *PNPLA3* i *TM6SF2*, polimorfizam *WNT3A-WNT9A* nije pokazao povezanost s jetrenom fibrozom zbog čega se čini da bi mogao biti čimbenik koji specifičnije opisuje rizik za HCC samo u alkoholnoj cirozi (82). Recentna

studija Bucha i sur., uz potvrdu povezanosti *PNPLA3* i *TM6SF2* s rizikom za HCC u alkoholnoj cirozi, identificirala je polimorfizam *TERT* rs2242652 koji ima protektivno djelovanje na HCC u alkoholnoj cirozi (83). Protektivno djelovanje *TERT* mutacije očituje se produljenjem telomera te regulacijom Wnt/ β -katenin signalnog puta koji ima važnu ulogu u alkoholom induciranoj hepatokarcinogenezi (83). Iako su svi navedeni polimorfizmi povezani s rizikom za alkoholnu cirozu i/ili HCC nisu specifični samo za alkoholom uzrokovan HCC te se čini da nisu dovoljni za objašnjenje rizika. Kako bi bolje procijenili rizik za nastanak HCC-a istraživan je i njihov zajednički utjecaj. Gellert-Kristensen i sur. istraživali su utjecaj polimorfizama gena *PNPLA3*, *TM6SF2* i *HSD17B13* udruženih u skor za procjenu genetskog rizika (engl. *genetic risk score*, GRS) te su pokazali povezanost s do 12x većim rizikom za cirozu te do 29x većim rizikom za HCC (84). U istraživanju koje je uključilo pacijente s cirozom neovisno o etiologiji i etničkoj pripadnosti korišten je GRS koji je uključivao polimorfizme gena *PNPLA3*, *MBOAT7*, *TM6SF2* i *GCKR* (engl. *glucokinase regulator*) te je pokazano da su pacijenti s najvećom frekvencijom rizičnih alela imali dvostruko viši rizik za HCC. Također, kombinacija ovog modela s od ranije poznatim rizičnim faktorima može dodatno doprinijeti stratifikaciji rizika (85). Navedena dva GRS-a uključila su polimorfizme za koje je poznato da utječu na metabolizam lipida te razvoj steatoze i fibroze jere te su pokazali povezanost s HCC-om ne samo u alkoholnoj cirozi nego i u drugim etiologijama. Nahon i sur. istražili su doprinos GRS-a sastavljenog od ukupno sedam SNP-ova od kojih je šest (*PNPLA3*, *TM6SF2*, *HSD17B13*, *APOE* i *MBOAT*) vezano uz metabolizam lipida te jedan (*WNT3A-WNT9A*) uključen u Wnt/ β -katenin signalni put koji se pokazao povezan s rizikom za HCC u alkoholnoj cirozi te su zaključili da primjena GRS-a, uz od ranije poznat klinički model aMAP (engl. *age, male, albumin-bilirubin, platelets*), tek skromno doprinosi procjeni rizika za HCC (86).

Dosadašnja istraživanja pokušala su identificirati cijeli niz biomarkera za HCC uzimajući u obzir genetske, epigenetske, kromosomske, transkripcijske i druge mehanizme uključene u onkogenezu no nijedan istraživani biomarker nije se pokazao klinički relevantan. U GWAS studijama identificiran je velik broj SNP-ova povezanih s HCC-om no njihov utjecaj nije vezan samo uz hepatokarcinogenezu niti je ta povezanost specifična za pojedinu etiologiju jetrene bolesti ili pojedinu etničku grupu. Čini se da bi kombinacija više SNP-ova udruženih u GRS mogla dodatno pridonijeti procjeni rizika no takvi modeli nisu pokazali dovoljnu specifičnost ili kliničku primjenjivost. S obzirom na vrlo kompleksnu i multifaktorijalnu patogenezu HCC-a, za preciznije razumijevanje genetskog rizika, potrebni su modeli koji će uključiti više genetskih čimbenika ali i čimbenike vezane uz domaćina i okoliš (69).

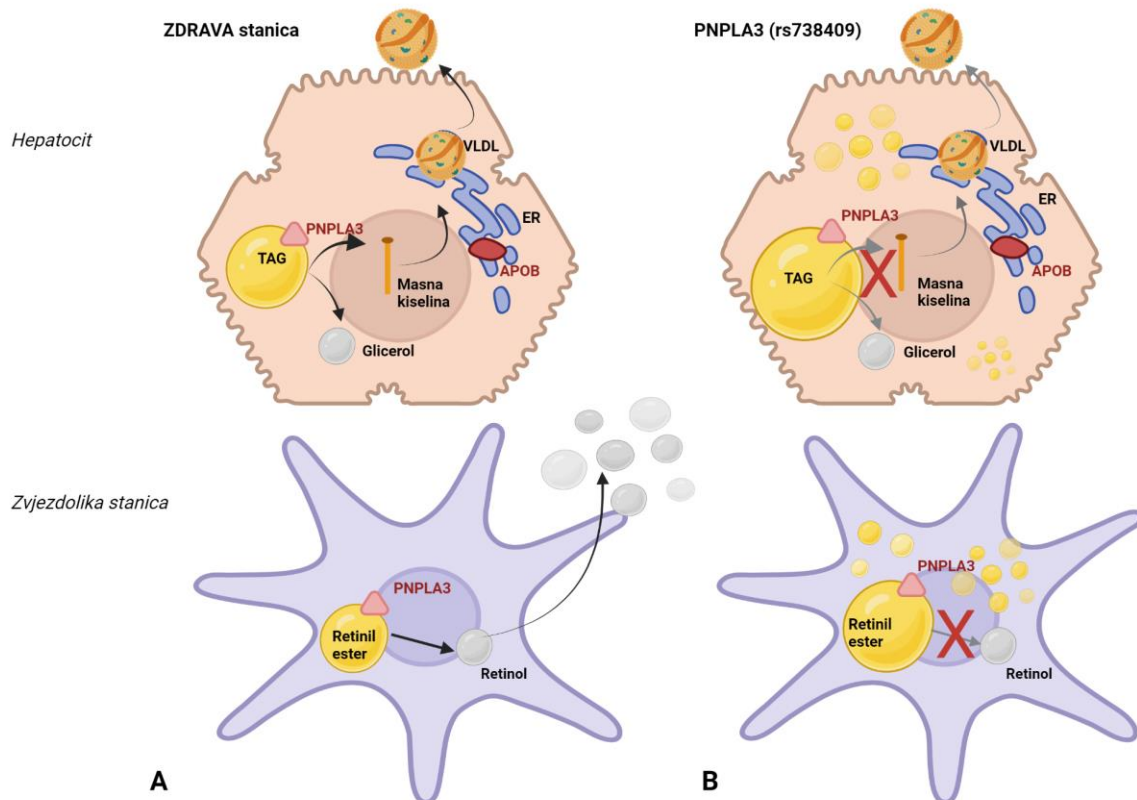


Slika 5. Genetski i ne-genetski čimbenici koji utječu na razvoj hepatocelularnoga karcinoma. HCC – hepatocelularni karcinom. Shema kreirana u BioRender.com

1.4.1. PNPLA3

PNPLA3 (engl. *Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3*) gen poznat još i kao adiponutrin (ADPN) ili kalcij-nezavisna fosfolipaza A2-epsilon transmembranski je protein iz porodice PNPLA obitelji smješten na dugom kraku 22. kromosoma (22q13). Ljudski PNPLA3 gen visoko je eksprimiran u hepatocitima, adipocitima i HSC-ama. PNPLA3 ima enzimsku funkciju triacilglicerol hidrolaze i acilglicerol transacetilaze te ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze metabolizma lipida. Polimorfizam *PNPLA3* rs738409 C>G (*PNPLA3* I48M) posljedica je zamjene citozina gvaninom te nepravilnog kodiranja metionina umjesto izoleucina na poziciji 148 u 3. egzonu *PNPLA3* gena. Ova mutacija rezultira smanjenjem funkcije triacilglicerol hidrolaze te nakupljanjem lipida u hepatocitima što doprinosi nastanku steatoze jetre i pridruženih bolesti.

U normalnim uvjetima *PNPLA3* gen nalazi se u lipidnim kapljicama hepatocita i HSC-a. U hepatocitima je odgovoran za metabolizam triglicerida i ekskreciju lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoprotein*, VLDL) dok u HSC-ama regulira hidrolizu estera retinola i ekskreciju retinola. Mutacija *PNPLA3* gena onemogućuje ove procese što dovodi do nakupljanja triglicerida u hepatocitima i retinola u HSC-ama (Slika 6.).



Slika 6. Funkcija *PNPLA3* gena u hepatocitima i zvezdolikim stanicama u normalnim uvjetima (A) i u slučaju mutacije *PNPLA3* gena (B). A) U normalnim hepatocitima *PNPLA3* ima funkciju triacilglicerol hidrolaze te metabolizira TAG i posreduje u sintezi i ekskreciji VLDL-a. U zvezdolikim stanicama *PNPLA3* hidrolizira retinil estere do retinola i pospješuje ekskreciju retinola. B) U hepatocitima i zvezdolikim stanicama s mutacijom *PNPLA3* onemogućena je hidroliza TAG-a i retinil estera što rezultira nakupljanjem masnih kapljica u stanicama. APOB – apolipoprotein B, ER – endoplazmatski retikulum, TAG – triacilglicerol, VLDL – lipoproteini vrlo niske gustoće. Shema kreirana u BioRender.com

Polimorfizam *PNPLA3* rs738409 najviše je istraživan u kontekstu NAFLD-a gdje je dokazana njegova povezanost s rizikom za razvoj steatoze jetre. U GWAS studiji na bolesnicima s histološki utvrđenim NAFLD-om dokazana je povezanost ovog polimorfizma s cijelim

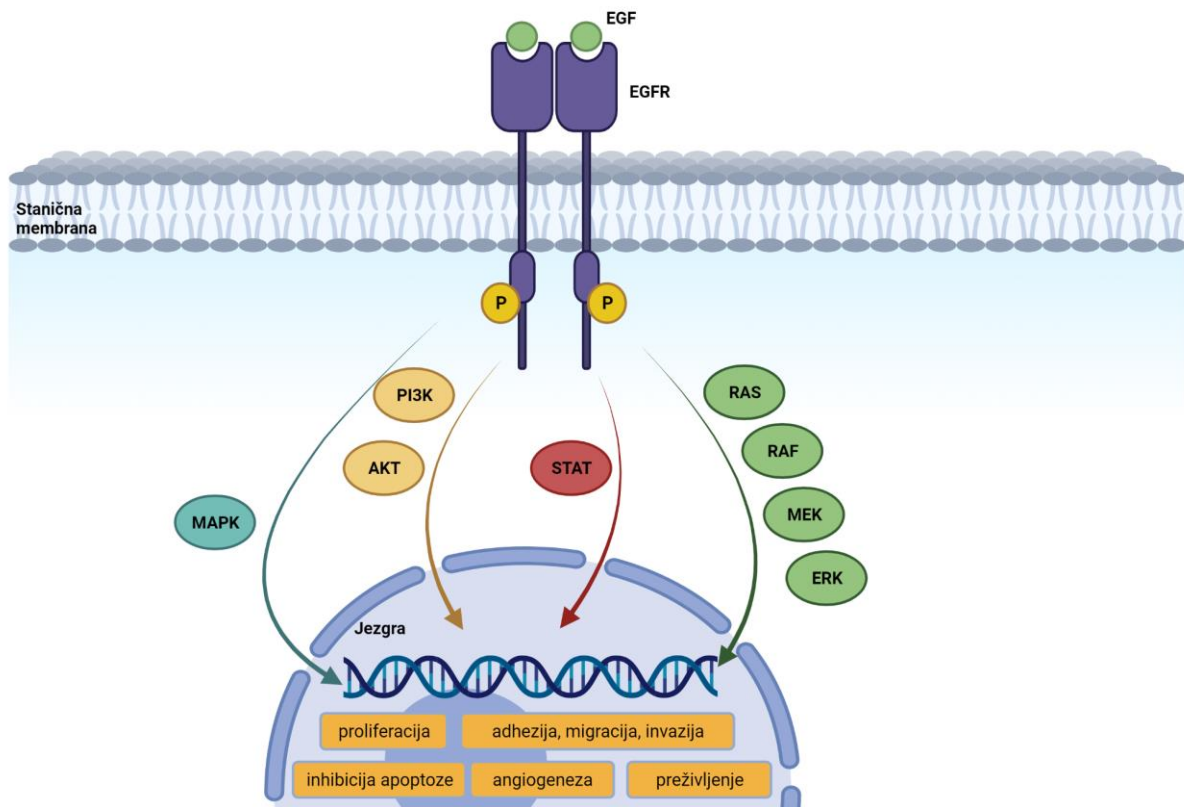
spektrum bolesti koji uključuje steatozu, stupanj steatohepatitisa i stadij fibroze jetre (87). Genotip CC ima protektivno djelovanje dok genotipovi CG i GG povećavaju rizik za razvoj steatoze koji je najveći kod nositelja genotipa GG (88). Daljnja istraživanja pokazala su snažnu povezanost *PNPLA3* s rizikom za razvoj steatoze, fibroze i ciroze te HCC-a ne samo u kontekstu NAFLD-a nego i u ALD-u i kroničnom hepatitisu C (89, 90). S obzirom da mutacija *PNPLA3* gena dovodi do akumulacije lipida (triglicerida u hepatocitima i estera retinola u HSC-ama) u jetri jasna je povezanost s razvojem steatoze jetre. S druge strane, nisu poznati točni mehanizmi kojim *PNPLA3* utječe na razvoj fibroze i nastanak HCC-a. Mutacija *PNPLA3* gena dovodi do nakupljanja retinola u HSC-ama koje se u kroničnim bolestima jetre transformiraju u miofibroblaste koji produciraju kolagen i druge proteine ECM-a odgovorne za razvoj fibroze. Prilikom transformacije HSC-a u miofibroblaste dolazi do otpuštanja retinola te se pretpostavlja da upravo taj gubitak retinola doprinosi njihovoj daljnjoj aktivaciji te razvoju fibroze i jetrenog oštećenja (89).

U kontekstu ALD-a, polimorfizam *PNPLA3* povezan je s rizikom za progresiju bolesti prema cirozi te nastanak HCC-a (74, 76, 92, 93, 94). Meta-analiza Salameha i sur. potvrdila je povezanost polimorfizma *PNPLA3* s cijelim spektrom ALD-a koja se povećava paralelno sa stupnjem jetrenog oštećenja (72). Istraživanje Mischitelli i sur. na talijanskoj populaciji bolesnika s izoliranim ALD-om pokazala je značajno višu učestalost *PNPLA3* polimorfizma kod bolesnika s cirozom u komparaciji s bolesnicima bez ciroze. Temeljem tih rezultata, autori su kreirali model za rano prepoznavanje ciroze jetre koji uz neke kliničke parametre koristi polimorfizme *PNPLA3* rs738409 i *HSD17B13* rs72613567 (95). Temeljem brojnih do sada provedenih istraživanja polimorfizam *PNPLA3* povezan je s ALD-om i HCC-om. Procjenjuje se da je rizik za razvoj ciroze kod bolesnika koji su nositelji G alela 26,6%, a bolesnici s alkoholnom cirozom i HCC-om češće su GG homozigoti (93). Istraživanje provedeno na europskoj populaciji bolesnika pokazalo je da je ovaj polimorfizam rizični čimbenik za pojavu HCC-a u ALD-u kao i za pojavu HCC-a u jetri bez fibroze (F0-1) (94). Usporedbom bolesnika s terminalnom fazom ALD-a koji su nositelji divljeg genotipa (CC) s nositeljima G alela bilo da su heterozigoti (CG) ili homozigoti (GG) vidjelo se da su ovi s rizičnim G alelom konzumirali značajno manje količine alkohola u jednakom vremenskom intervalu (96). Istraživanjem ovog polimorfizma kod bolesnika koji su kandidati za transplantacijsko liječenje uočeno je da nositelji G alela imaju kraće vrijeme do dekompenzacije te pojave hepatalne encefalopatije kao i kraće preživljenje na listi za transplantaciju (96).

1.4.2. EGF

Epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) dio je obitelji peptidnih faktora rasta – agonista za tirozin kinazne receptore (engl. *receptor tyrosine kinases*, RTK) koji se nazivaju ErbB ili HER receptori. Receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) je tirozin-kinazni transmembranski receptor na epitelnim stanicama. Vezanjem EGF za EGFR aktivira se signalni put koji je jedan od ključnih regulatora stanične proliferacije, diferencijacije, migracije i preživljenja te ima važnu ulogu u brojnim bolestima, posebice u nastanku karcinoma.

EGF obitelj dijeli se u tri kategorije faktora rasta, a EGF zajedno s TGF α , amfiregulinom i betacelulinom spada u prvu kategoriju koja se veže na EGFR. EGF nastaje iz svog prekursora, transmembranskog glikoproteina, sastavljenog od ekstracelularnog, transmembranskog i intracelularnog segmenta. Ekstracelularni dio se cijepa i oslobađa proteolitičkim djelovanjem transmembranskih proteina iz porodice disintegrina i metaloproteinaza (engl. *a disintegrin and metalloproteinase*, ADAMs). Takav aktivni EGF veže se za EGFR. RTK obitelj čine 4 receptora: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER 4) koji su transmembranski glikoproteini i sastoje se od izvanstanične domene na koju se veže ligand, transmembranske domene, jukstamembranskog dijela te tirozin kinazne domene i C-terminalnog kraja koji sadrži tirozin. Vezanjem liganda za receptor dolazi do njegove homo- ili hetero-dimerizacije te aktivacije tirozin-kinaze i fosforilacije C-terminalnog kraja što dalje pokreće niz signalnih puteva. Neki od signalnih puteva su: KRAS-BRAF-MEK-ERK put, Ras/MAPK, fosfoinozimid 3-kinazni (PI3K), fosfolipaza C/protein kinaza C (PLC/PKC), anti-apoptotički kinazni (Akt) i STAT signalni put koji utječu na staničnu proliferaciju, angiogenezu, migraciju, adheziju i preživljenje (Slika 7.) (97, 98).



Slika 7. EGF/EGFR signalni put. Vezanjem EGF za EGFR dolazi do homo- ili hetero-dimerizacije receptora, aktivacije tirozin-kinaze i fosforilacije C-terminalnog kraja što dalje pokreće niz signalnih puteva koji reguliraju različite procese u stanici. EGF – epidermalni faktor rasta, EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta . Shema kreirana u BioRender.com

Prekomjerna ekspresija EGFR-a jedan je od dobro poznatih mehanizama u nastanku solidnih tumora, a povezuje se s lošijim kliničkim ishodima, uznapredovalim stadijima tumora i rezistencijom na kemoterapeutike. Prekomjerna ekspresija EGFR-a ima važnu ulogu i u nastanku HCC-a te stvaranju lokalnih kao i udaljenih metastaza. S druge strane, inhibicija RTK-a jedan je od mehanizama u liječenju HCC-a, dok su brojne mutacije EGFR-a odgovorne za razvoj rezistencije na lijekove i daljnju progresiju tumora (99, 100). EGF/EGFR signalni put potiče tumorske stanice na proizvodnju upalnih faktora (IL-8, IL-6, IL-1, CXCL-12) i kemoatraktana CXCL5 i CXCL8 koji privlače tumorske stanice i leukocite čime se stvara upalni mikrookoliš koji podržava daljnju proliferaciju, diferencijaciju i angiogenezu tumorskih stanica. Tumorske stanice HCC-a autokrino proizvode EGF što dovodi do prekomjerne ekspresije EGF/EGFR i podržava stvaranja upalnog mikrookoliša. EGF također povećava

proliferaciju tumorskih stanica s niskim metastatskim potencijalom te pokreće stanice s niskim i visokim metastatskim potencijalom što utječe na lošiju prognozu i preživljenje bolesnika (101). Istraživanja na staničnim kulturama pokazala su da je EGF odgovoran za agresivniji tumorski rast, invaziju i migraciju tumorskih stanica te veću sklonost metastaziranju (102).

Polimorfizam *EGF* rs4444903 posljedica je zamjene adenozina (A) u gvanin (G) na 5' kraju neprepisujuće regije *EGF* gena što rezultira povišenom tkivnom ekspresijom EGF-a. Ovaj polimorfizam povezan je s rizikom za nastanak HCC-a za što je odgovoran G alel dok A alel ima protektivno djelovanje. Povezanost *EGF* s HCC-om istraživana je u brojnim studijama na različitim populacijama te ovisi o etiologiji jetrene bolesti, etničkoj pripadnosti i prisutnosti ciroze. Polimorfizam *EGF* rs4444903 pokazao se kao rizični čimbenik za nastanak HCC-a u europskoj i azijskoj populaciji te kod bolesnika s cirozom i HCV infekcijom (103, 104, 105, 108). Meta-analiza Wanga i sur. pokazala je da nositelji G alela imaju 40% veći rizik za razvoj HCC-a u općoj populaciji dok se podanalizom prema etničkoj pripadnosti ovaj polimorfizam pokazao kao rizični čimbenik za HCC u europskoj i azijskoj populaciji (106). Analizom podgrupa ispitanika ovaj polimorfizam pokazao se kao rizični čimbenik za HCC kod zdravih pojedinaca te onih s cirozom i HCV infekcijom (106, 107, 108). U populaciji bolesnika s HCV cirozom, genotipovi AG i GG povezani su s rizikom za kliničko pogoršanje, brže napredovanje prema bolesti i lošije preživljenje (109). Istraživanje učinjeno na bolesnicima s cirozom neovisno o etiologiji pokazalo je da nositelji genotipa AG imaju 2,4x, a nositelji GG genotipa 4x veći rizik za nastanak HCC-a u odnosu na nositelje genotipa AA. U istoj studiji učinjena je podanaliza bolesnika s alkoholnom cirozom jetre s i bez HCC-a koja je pokazala da genotip GG ima 2,9x veći rizik za HCC u odnosu na genotip AA odnosno da je G alel značajno povezan s nastankom HCC-a (110). Ovo je jedino istraživanje u kojem je istražen utjecaj polimorfizma *EGF* gena kod bolesnika s alkoholnom cirozom no podaci su limitirani činjenicom da se radi o malom i nerepresentabilnom uzorku (121 bolesnik s alkoholnom cirozom od kojih 44 s HCC-om) na uzorku iste rase i nacionalnosti.

1.4.3. Notch signalni put

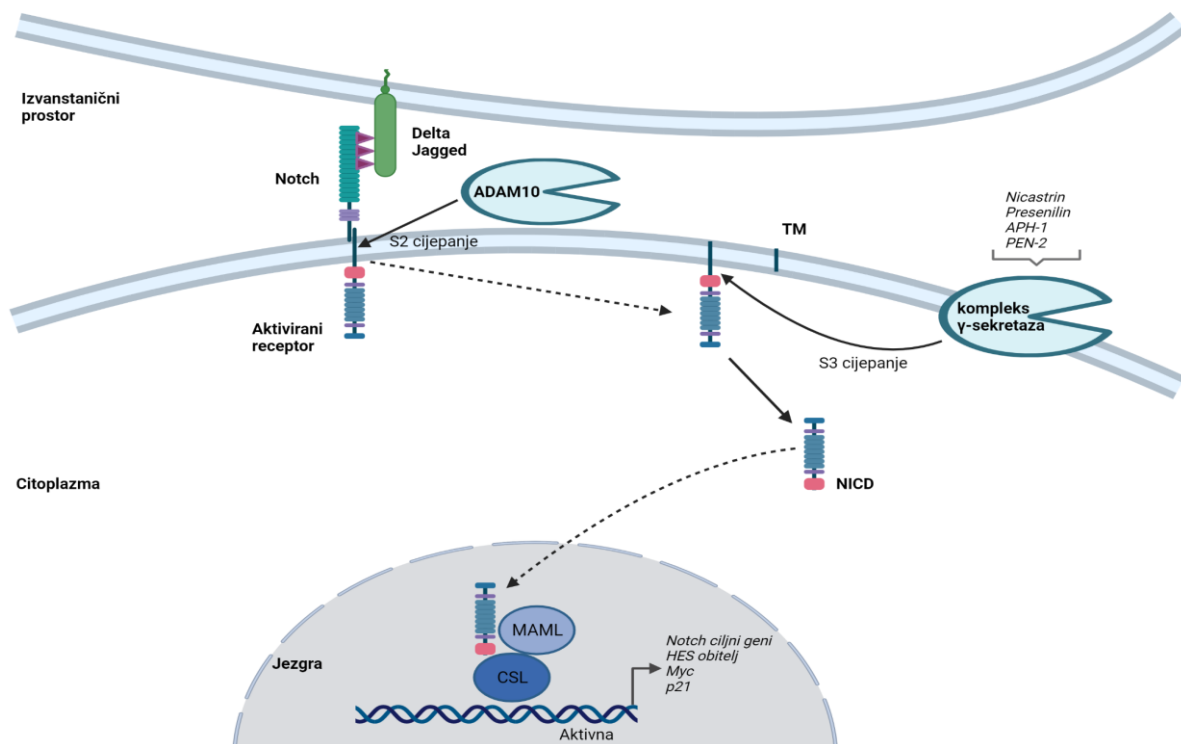
Notch signalni put visoko je očuvan signalni mehanizam prisutan u višestaničnim organizmima koji regulira staničnu proliferaciju, diferencijaciju i smrt, a prvi puta je otkriven u vinskoj mušici, *D. melanogaster*. Čine ga Notch receptori i njihovi ligandi Delta i Serrate (u sisavaca poznati još kao Jagged) koji su transmembranski proteini. U sisavaca postoje četiri Notch receptora, Notch1-4 te 5 liganda: delta slični ligandi 1, 3 i 4 (engl. *delta-like ligand*, DLL) i JAG1 i 2 (engl. *jagged*). Svaki ligand ima određenu funkciju; DLL1 upravlja staničnom diferencijacijom i međustaničnom komunikacijom, DLL3 indukcijom apoptoze suprimira stanični rast, DLL4 aktivira NF- κ B signalni put koji potiče sekreciju vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i tumorske metastaze, JAG1 potiče angiogenezu dok JAG2 potiče staničnu proliferaciju i preživljenje. Interakcije između Notch receptora i njihovih liganda događaju se jukstakrino što znači da se ligandi na membrani jedne stanice vežu na receptor na susjednoj stanici te se pokreće niz reakcija koje dovode do pojačane ekspresije gena vezanih uz Notch.

Prekursor Notch receptora nastaje u endoplazmatskom retikulumu nakon čega se transportira u Golgijev aparat gdje se cijepa (S1 cijepanje) u heterodimere koji predstavljaju zrelu formu Notch receptora koji se zatim transportiraju na staničnu membranu. Izvanstanična domena receptora sastoji se od 29 do 36 EGF-sličnih ponavljajućih sljedova i negativne regulacijske regije (engl. *negative regulatory region*, NRR) koja sprječava aktivaciju receptora u odsustvu liganda. NRR sadrži heterodimerizacijsku domenu koja je ključna za S2 cijepanje, a na koju se veže unutarstanična domena receptora (engl. *Notch intracellular domain*, NICD).

Većina Notch liganada slične su strukture kao i receptori. Radi se o transmembranskim proteinima koji se sastoje od tri povezana strukturalna motiva: N-terminalni DSL (Delta/Serrate/LAG-2) motiv, DOS domena (engl. *Delta and OSM-11-like proteins*) i ponavljajući EGF-sličan motiv. Ligandi su raspodijeljeni na membrani gdje mogu vezati receptor, a postaju aktivni tek nakon ubikvitinilacije koju provode Neur (Neuralized) ili Mib (Mindbomb).

Vežanjem liganda za Notch receptor dolazi do dva proteolitička cijepanja tog receptora. U prvom koraku cijepanje je posredovano metaloproteinazama ADAMs (S2 cijepanje) te dolazi do odvajanja izvanstaničnog dijela Notch receptora. Na ostatak receptora koji se naziva skraćeni izvanstanični Notch (engl. *Notch extracellular truncation*, NEXT) i sastoji se od

transmembranske i unutarstanične domene djeluju γ -sekretaze (S3 cijepanje). γ -sekretaze predstavljaju kompleks enzima koji sadrži presenilin, nicastrin, PEN2 i APH1. Nakon drugog cijepanja dolazi do oslobađanja NICD-e koja se dalje prenosi u jezgru stanice. NICD u jezgri zajedno s DNK-vezujućim proteinima RBP-JK (poznati i kao CSL) i MAML (engl. *mastermind-like*) formira trojni kompleks koji dalje regurgitira druge koaktivatore i potiče transkripciju ciljnih gena HES (engl. *Hairy/Enhancer of Split*) i HEY (engl. *Heiry/Enhancer of Split related to YRPW motif*) (Slika 8.). To je takozvani kanonski Notch signalni put uz koji postoji i nekanonski signalni put. U nekanonskom Notch signalnom putu dolazi do endocitoze Notch receptora koji mogu biti vraćeni nazad na membranu, razgrađeni u lizosomu ili aktivirani u endosomu što predstavlja ligand-neovisnu aktivaciju receptora koja je ključna za razvoj T-limfocita. U nekanonskom putu, NICD neovisno o CSL može aktivirati niz signalnih puteva te na taj način regulirati transkripciju ciljnih gena. Jedan od tako aktiviranih puteva je i NF- κ B, a povezan je s razvojem kolorektalnog karcinoma, karcinoma dojke i cerviksa te mikrocelularnog karcinoma pluća (111, 112, 113, 114).



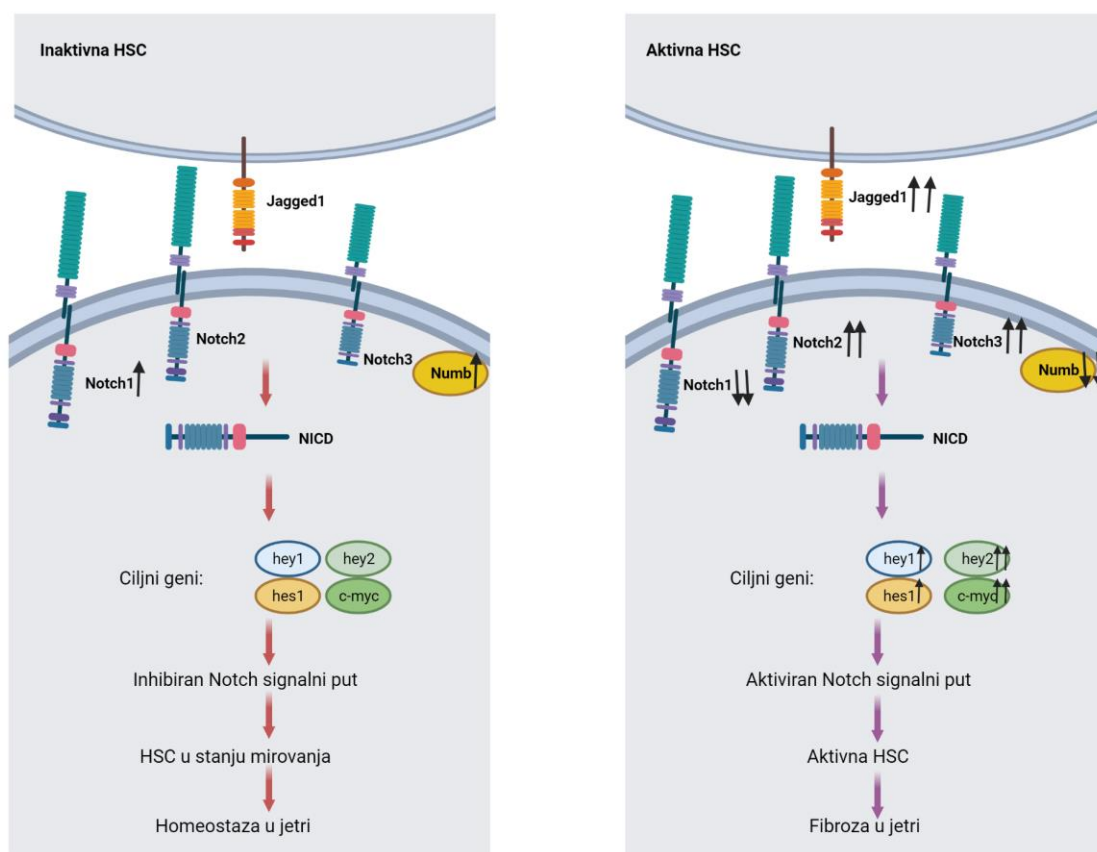
Slika 8. Notch signalni put. Vezanjem liganda (Delta, Jagged) za Notch receptor dolazi do aktivacije Notch receptora. U prvom koraku posredstvom metaloproteinaza ADAM10 (S2 cijepanje) odvaja se izvanstanični dio receptora. U slijedećem koraku posredstvom γ -sekretaza (S3 cijepanje) dolazi do odvajanja transmembranskog (TM) i unutarstaničnog dijela receptora (NICD) koji se prenosi u jezgru stanice gdje formira trojni kompleks s DNK-vezujućim proteinima MAML i CSL te dalje potiče transkripciju ciljnih gena. Shema kreirana u BioRender.com

1.4.4. Notch signalni put u bolestima jetre

Notch signalni put ima ključnu ulogu tijekom fetalnog razvoja jetre, a istraživanja posljednjih godina sve više pokazuju da igra bitnu ulogu i u razvoju kroničnih jetrenih bolesti. Jedan od poremećaja uzrokovan promjenama ovog signalnog puta je i Alagilleov sindrom; autosomno dominantni poremećaj koji se očituje manjkom i strukturnim promjenama žučnih vodova, a osim promjena u jetri može se očitovati i promjenama na bubrezima, skeletu, očima, licu te kardiovaskularnom sustavu. Alagilleov sindrom u 94-96% slučajeva uzrokuju mutacije JAG1 liganda, a samo 2-4% slučajeva uzrokuju mutacije Notch2 receptora (115). Mutacije JAG1 nalaze se u izvanstaničnom dijelu ovog liganda koji se direktno veže za Notch2 receptor, a najčešće se radi o velikim insercijama ili delecijama koje zahvaćaju pojedinačne egzone ili cijeli gen. U slučaju Notch2 mutacija radi se o manjim tzv. missense mutacijama koje se nalaze u funkcionalnim motivima ovog receptora važnim za JAG1-Notch2 interakciju (izvanstanična EGF slična ponavljanja) ili za interakciju Notch2 s transkripcijskim faktorima i regulaciju ekspresije gena (unutarstanična ankyrin ponavljanja).

Notch signalni put ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju jetre jer regulira pretvorbu hepatoblasta te daljnji razvoj bilijarnog stabla. Aktivacija Notch signalnog puta odgovorna je za usmjeravanje jetrenih progenitorskih stanica u žučnu lozu dok Notch inaktivacija te stanice usmjerava u hepatocitnu lozu (116).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da Notch signalni put ima ulogu u nastanku jetrene fibroze. U *in vitro* istraživanjima dokazano je da HSC-e ekspimiraju Notch receptore (JAG1) što ima važnu ulogu u daljnjoj aktivaciji i diferencijaciji tih stanica u miofibroblaste (117). Put od HSC-a do miofibroblasta odvija se kroz tzv. epitelno-mezenhimalnu tranziciju (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) pri čemu epitelne stanice poprimaju mezenhimalni fenotip, mijenjaju svoju citoskeletnu strukturu, gubi se ekspresija E-kadherina i apikalno-bazalni polaritet stanica te one poprimaju fenotip miofibroblasta. Stalna izloženost upali/stresu pokreće EMT-u te daljnju proliferaciju fibroblasta, a glavni pokretač tog procesa je TGF β . Notch signalni put direktno utječe na EMT-u putem svoje NICD domene te potiče ekspresiju mezenhimalnih markera, kolagena i vimentina odnosno indirektno na način da regulira EMT-u preko drugih signalnih puteva; TGF β , NF- κ B i β -katenina (118). U aktivnim HSC-ama prisutna je visoka ekspresija JAG1 liganda te Notch2 i Notch3 receptora dok je smanjena ekspresija Notch1 receptora i Numb proteina što podržava napredovanje jetrene fibroze (Slika 9.) (119).



Slika 9. Ekspresija Notch receptora u inaktivnim i aktivnim zvjezdolikim stanicama jetre. U aktivnim zvjezdolikim stanicama prisutna je visoka ekspresija JAG1 liganda te Notch2 i Notch3 receptora dok je smanjena ekspresija Notch1 i Numb. Vezanjem JAG1 liganda na Notch receptor oslobađa se NICD koja potiče transkripciju ciljnih gena koji dalje aktiviraju HSC-e i potiče razvoj fibroze u jetri. HSC – jetrena zvjezdolika stanica, NICD – Notch unutarstanična domena Shema kreirana u BioRender.com

Notch signalni put uključen je i u nastanak HCC-a. Dosadašnja istraživanja na animalnim modelima kao i na bolesnicima s HCC-om pokazala su povišenu ekspresiju Notch 1, Notch 3, Notch 4 i JAG1 u tumorskom tkivu (120). Prekomjerna ekspresija Notch3 prisutna je u oko 78% HCC-a. Povišena ekspresija Notch3 u HCC-u rezultira povišenom ekspresijom HES1 gena, a utječe i na regulaciju razine p53 gena te se povezuje s agresivnijim tumorskim rastom, izbjegavanjem apoptoze, vaskularnom invazijom, progresijom HCC-a i stvaranjem metastaza (121, 122, 123). Notch3 kao i Notch1 imaju slične uloge u kontekstu HCC-a i oba gena odgovorna su za invaziju, metastaziranje i progresiju tumora te lošije ukupno preživljenje (124). Notch3 povezan je s razvojem rezistencije na sorafenib te se inhibicija Notch3 pokazala kao učinkovit mehanizam kojim se može povećati učinkovitost lijeka (125). Iako su brojna

istraživanja na animalnim i ljudskim modelima dokazala povezanost Notch signalnog puta s nastankom HCC-a, malo je podataka o specifičnom utjecaju polimorfizma *NOTCH3* rs1043996 gena. U istraživanju na kineskoj populaciji bolesnika s HBV infekcijom i histološki dokazanim HCC-om dokazana je povišena ekspresija Notch3 u tumorskom tkivu te povezanost polimorfizma *NOTCH3* rs1043996 s lošijim ukupnim preživljenjem pri čemu je A alel protektivan dok je G alel odgovoran za povišen rizik (126).

2. HIPOTEZA

Polimorfizmi pojedinih nukleotida gena *PNPLA3* (rs738409), *NOTCH3* (rs1043996) i *EGF* (rs4444903) rizični su čimbenici za razvoj HCC-a u alkoholnoj cirozi jetre, kao i za razvoj recidiva HCC-a nakon transplantacije jetre.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Istražiti povezanost polimorfizama gena *PNPLA3* rs738409, *NOTCH3* rs1043996 i *EGF* rs4444903 s rizikom pojave HCC-a u populaciji pacijenata transplantiranih zbog alkoholne ciroze jetre.

3.2. Specifični ciljevi:

1. Odrediti učestalost polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* u pacijenata s alkoholnom cirozom.
2. Odrediti učestalost polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* u pacijenata s alkoholnom cirozom i HCC-om.
3. Istražiti povezanost polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* s pojavom HCC-a među pacijentima s alkoholnom cirozom.
4. Istražiti povezanost ostalih rizičnih čimbenika s pojavom HCC-a među pacijentima s alkoholnom cirozom te utvrditi jesu li polimorfizmi gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* neovisni rizični čimbenici.
5. Istražiti povećava li kombinacija polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* rizik za HCC.
6. Istražiti postoji li povezanost polimorfizama gena *PNPLA3*, *NOTCH3* i *EGF* s rizikom za recidiv HCC-a nakon transplantacije jetre.
7. Istražiti povezanost ostalih rizičnih čimbenika (broj i veličina tumora, vrijednosti AFP-a, histološke karakteristike tumora) s recidivom HCC-a nakon transplantacije jetre te utvrditi jesu li ovi polimorfizmi neovisni rizični čimbenici.

4. MATERIJALI I METODE

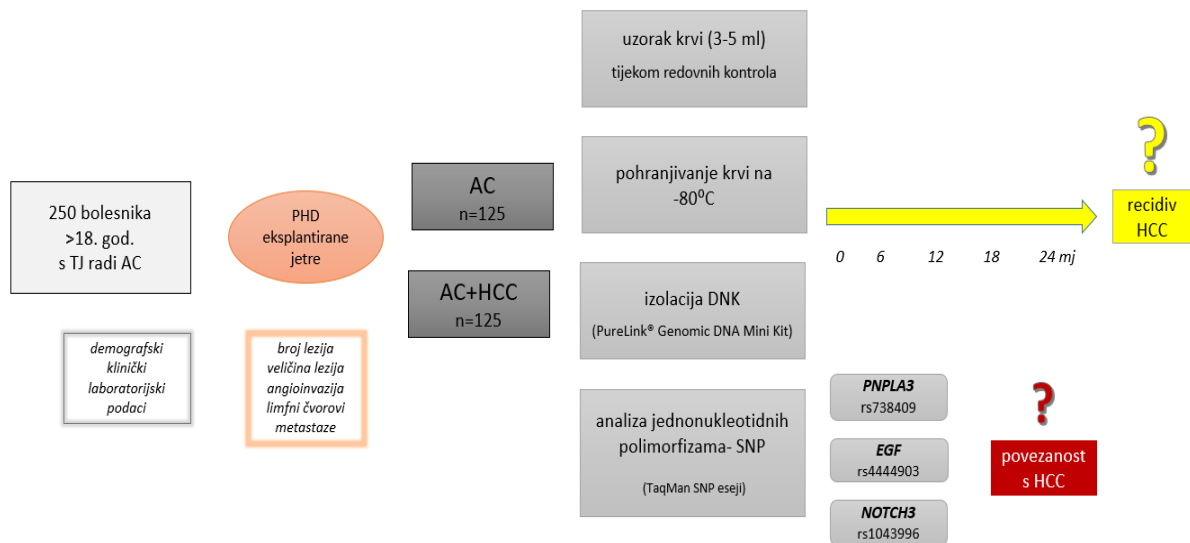
4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u obliku retrospektivne studije na skupini od 260 bolesnika liječenih transplantacijom jetre u KB Merkur zbog završne faze alkoholne bolesti jetre/alkoholne ciroze i HCC-a. Od navedenih 260 bolesnika, njih 132 imalo je alkoholnu cirozu dok je njih 128 uz alkoholnu cirozu imalo i HCC. Od uključenih 260 bolesnika, 253 liječeno je kadaveričnom transplantacijom jetre dok je preostalih 7 evaluirano za transplantaciju no ista nije učinjena jer su bili su izvan Milanskih i San Francisco (engl. *the University of California San Francisco*, UCSF) kriterija. Ispitanici su bili grupirani prema spolu i dobi. Liječenje transplantacijom provedeno je između 2009. i 2021. godine te su svi ispitanici praćeni do 2023. godine, odnosno najmanje dvije godine nakon transplantacije radi evaluacije ranog recidiva HCC-a.

Uključni kriteriji bili su: dob starija od 18 godina, izolirana alkoholna bolest jetre, histološki verificiran HCC u skupini bolesnika s karcinomom.

Isključni kriteriji bili su: pridružene bolesti jetre (virusne/metaboličke/autoimune), prisutnost tumora nekog drugog sijela osim jetre, anamneza o ranijem liječenju od maligne bolesti, prethodno učinjena transplantacija solidnog organa ili multiorganska transplantacija, komorbiditet koji bi bio kontraindikacija za liječenje transplantacijom.

Za prikupljanje anamnestičkih podataka, laboratorijskih podataka, podataka o etiologiji jetrene bolesti te podataka o HCC-u korištena je medicinska dokumentacija dostupna u bolničkom informacijskom sustavu. Klasifikacija HCC-a unutar Milanskih ili UCSF kriterija temeljena je na patohistološkim nalazima eksplantirane jetre iz kojih su dobiveni podaci o broju i veličini lezija, prisutnosti angioinvazije te prisutnosti pozitivnih limfnih čvorova. Pacijentima koji nisu liječeni transplantacijom učinjena je biopsija jetre te je HCC histološki verificiran. Za potrebe određivanja istraživanih polimorfizama, ispitanicima je nakon potpisivanja informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju, tijekom redovnih kontrola, izvađena dodatna epruveta venske krvi (3-5 mL krvi) koja je pohranjena na -80°C do izolacije deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNK). Pohrana uzoraka, izolacija DNK te određivanje polimorfizama istraživanih gena učinjeni su u Laboratoriju za molekularnu imunologiju pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga.



Slika 10. Plan istraživanja. Istraživanje je uključilo bolesnike s TJ zbog alkoholne ciroze s ili bez HCC-a kojima je uzorkovana krv za izolaciju DNK i analizu polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3*, nakon čega je analizirana njihova povezanost s rizikom pojave HCC-a te rizikom za rani recidiv HCC-a. Dijagnoza i stadij HCC-a temeljena je na patohistološkom nalazu eksplantirane jetre. AC – alkoholna ciroza, DNK – deoksiribonukleinska kiselina, HCC – hepatocelularni karcinom, SNP polimorfizam pojedinog nukleotida, TJ – transplantacija jetre

4.2. Kemikalije i uređaji

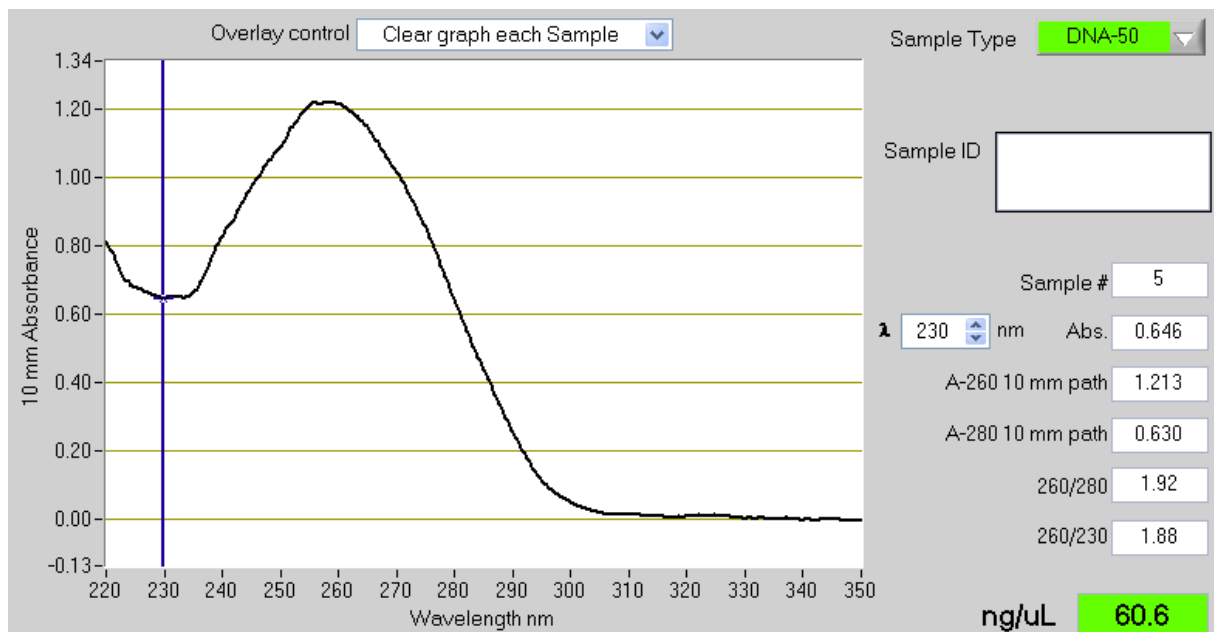
U istraživanju su korišteni sljedeći reagensi i uređaji:

- kit za izolaciju DNK iz krvi: QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Venlo, Nizozemska, kataloški broj: 51106)
- TaqMan genotipizacijski esej za analizu genskih polimorfizama (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD, kataloški broj: 4351379, detalji su prikazani u Tablici 3.)
- mješavina potrebna za PCR reakciju (TaqMan™ Genotyping Master Mix, kataloški broj: 4371355)
- potrošni materijal i manja oprema: rukavice, epruvete za PCR, sterilni nastavci za pipetu PCR čistoće, pipete, PCR pločice od 96 bunarića, centrifuge
- apsolutni etilni alkohol

- Spektrofotometar NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- uređaj za PCR ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- računalni program Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

4.3. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline

Deoksiribonukleinska kiselina ekstrahirana je iz uzorka pune krvi (200 µL) koristeći komercijalno dostupni proizvod QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Venlo, Nizozemska, kataloški broj: 51106) prema uputi proizvođača. Ukratko: na dno epruvete za polimeraza lančanu reakciju (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) najprije je ispipetirano 20 mikrolitara proteaze, a zatim je dodano 200 mikrolitara krvi. Uzorci su promiješani na električnoj miješalici (vorteks) nakon čega je dodano 200 mikrolitara pufera za liziranje stanica (engl. *lysing buffer*). Uzorci su zatim inkubirani 10 minuta na 56°C nakon čega je dodano 200 mikrolitara apsolutnog etanola te je sadržaj ponovno promiješan na vorteksu. Sadržaj epruvete je zatim prebačen u kolumnu za izolaciju DNK smještenoj unutar epruvete za prikupljanje te centrifugiran (6000 g, 1 min). Nakon centrifugiranja epruveta za prikupljanje je zajedno sa sadržajem bačena, a kolumna u kojoj se nalazi DNK je prebačena u novu epruvetu za prikupljanje. Dodano je 500 mikrolitara pufera za ispiranje 1 (engl. *washing buffer 1*) i sadržaj je ponovno centrifugiran (6000 g, 1 min) te je kolumna u kojoj se nalazi DNK ponovno prebačena u novu epruvetu za prikupljanje dok je upotrebljena epruveta za prikupljanje bačena. Dodano je 500 mikrolitara pufera za ispiranje 2 (engl. *washing buffer 2*) i sadržaj je ponovno centrifugiran (20000 g, 3 min). Epruveta za prikupljanje je zajedno sa sadržajem bačena, a kolumna u kojoj se nalazi DNK je prebačena u epruvetu za PCR od 1,5 mL. Dodano je 80 mikrolitara otopine za otapanje (engl. *elution buffer*), nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi sadržaj je centrifugiran (6000 g, 1 min) te je DNK otopljena u puferu dospjela u epruvetu za PCR. Koncentracija i kvaliteta DNK određena je koristeći NanoDrop ND1000 spektrofotometar mjerenjem apsorbancije na 260 nm, a kao pokazatelji kvalitete i čistoće izolirane DNK korišteni su omjeri 260/230 i 280/260 (Slika 11.). Svi uzorci bili su pohranjeni na -20°C do analize SNP-ova gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3*.



Slika 11. Mjerenje koncentracije izolirane DNK na spektrofotometru NanoDrop ND1000. Izolirana je DNK zadovoljavajuće koncentracije (60,6 ng/μL i kvalitete (260/280 = 1.92, 260/230 =1,88). Za potrebe određivanja koncentracije iskorišten je 1μL uzorka, a kao slijepa proba korištena je otopina za razrjeđivanje.

4.4. Određivanje jednonukleotidnih polimorfizama gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze

Izolirana genomska DNK analizirana je za kvantitativnu PCR na uređaju ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD).

Polimorfizmi gena *PNPLA3* rs738409, *EGF* rs4444903 i *NOTCH3* rs1043996 određivani su PCR reakcijama koristeći komercijalno dostupne setove kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. U tablici su prikazani korišteni TaqMan eseji za svaki od analiziranih polimorfizama (Tablica 1.).

Tablica 1. Korišteni TaqMan eseji za genotipizaciju.

SNP ID	Gen	Broj eseja	Očekivani MAF
rs738409 C>G	<i>PNPLA3</i>	C_____7241_10	22.5 %
rs4444903 A>G	<i>EGF</i>	C__27031637_30	39 %
rs1043996 A>G	<i>NOTCH3</i>	C__22275447_10	31 %

Podatak za MAF pronađen je u internetskoj bazi podataka SNP database, dostupnoj preko poveznice: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Uzet je podatak za europsku populaciju.

EGF – epidermalni faktor rasta, MAF – učestalost slabije zastupljenog alela, PNPLA3 – protein 3 koji sadrži domenu fosfolipaze u obliku patatina, SNP – polimorfizam jednog nukleotida. ,

Za svaki uzorak izolirane DNK pripremljeno je 40 μ L uzorka DNK koncentracije 4 ng/ μ L koristeći sljedeću formulu.

$V \text{ uzorka } (\mu\text{L}) = 200 / \text{izmjerena koncentracija DNK u uzorku}$

$V \text{ čiste vode } (\mu\text{L}) = 40 - V \text{ uzorka } (\mu\text{L})$

Za izvođenje PCR-a zatim je pripremljena dovoljna količina otopine koja je po svakom od analiziranih uzoraka sadržavala 12,5 μ L TaqMan-ovog master mixa za genotipizaciju, 1,25 μ L odgovarajućeg TaqMan-ovog eseja (20X) i 11,25 μ L čiste vode (koja je slobodna od nukleinskih kiselina). U svaki bunarić na PCR pločici ispipetirano je 20 μ L ove otopine i 5 μ L uzorka (20 ng DNK) za genotipizaciju.

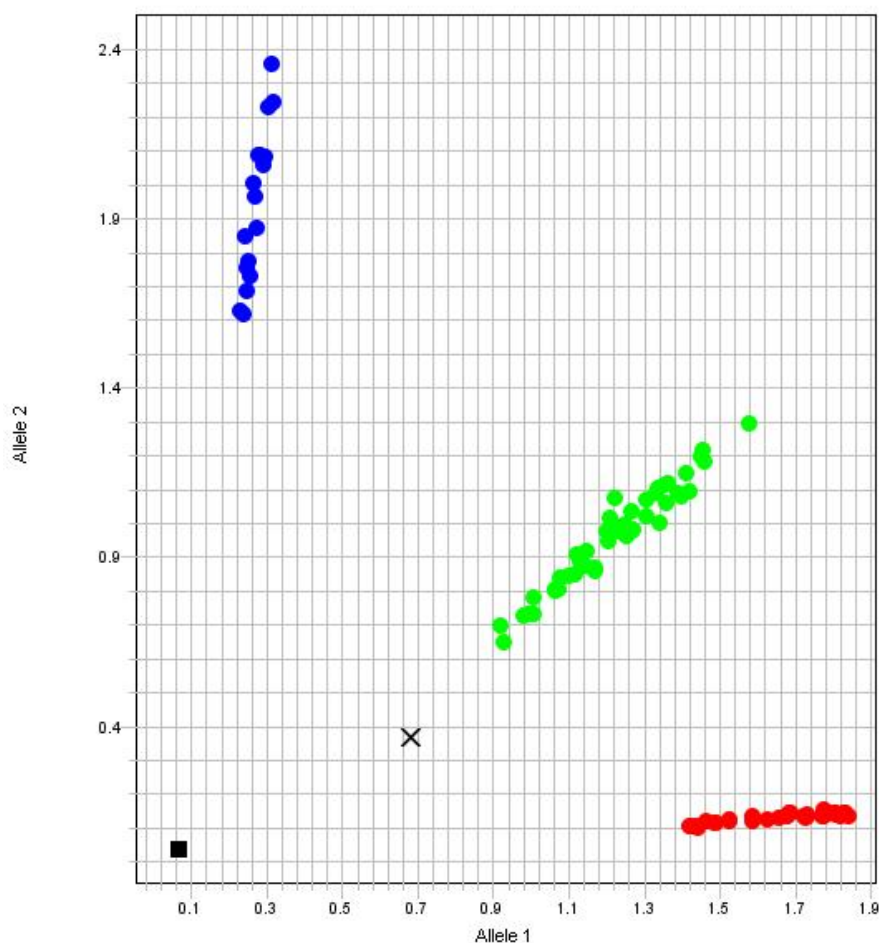
TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih začetnika i probe za specifično prepoznavanje alela. Proba koja se nalazi na 5' kraju naziva se još i reporter te ima fluorescentnu boju 6-FAM (6-karboksifluorescein) koja odašilje svjetlost valne duljine 517 nm ili VIC (VIC-fosforamidit) koja emitira svjetlost valne duljine 543 nm, dok se na 3' kraju nalazi hvatač fluorescencije (engl. *nonfluorescent quenchers*, NFQ) koji pod određenim uvjetima hvata fluorescenciju od reportera s 5' kraja. Kada se tijekom reakcije odvoje reporter i hvatač fluorescencije dolazi do stvaranja signala koji aparat može detektirati. Tijekom samog procesa dolazi do vezanja začetnika te se započinje novi proces amplifikacije DNK tj. stvaranje novog komplementarnog lanca DNK pri čemu začetnik nailazi na probu koju cijepa te dolazi do odvajanja reportera s fluorescentnom

bojom i hvatača što dovodi do porasta fluorescencije koji detektira uređaj, a isto se ponavlja sa svakim novim ciklusom.

Za svaki gen korištena su dva seta s istim začetnicima i po dvije probe označene različitim fluorescentnim bojama koje su specifične za svaku testiranu mutaciju. Svaka reakcija učinjena je u duplikatu.

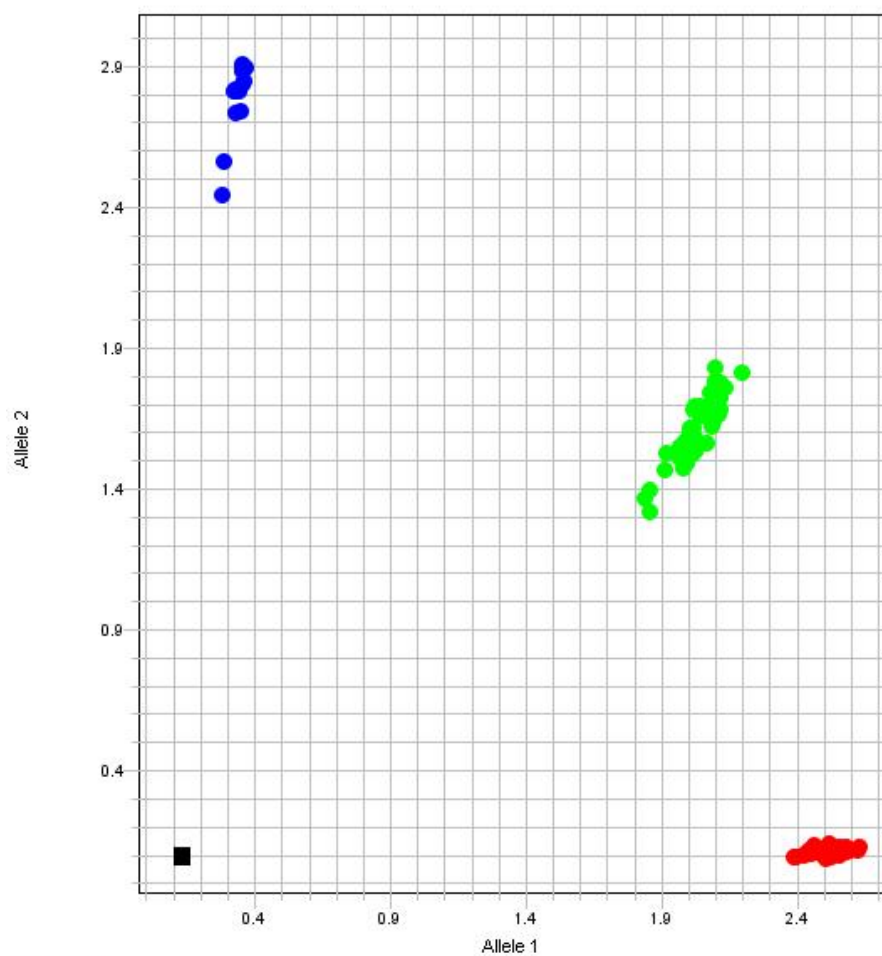
PCR-amplifikacija učinjena je na pločicama s 96 bunarića s pozitivnim i negativnim kontrolama. Uzorci izolirane genomske DNK, TaqMan Assay set (s dvjema fluorescentnim probama) i set kemikalija za PCR (TaqMan Genotyping Master Mix) inkubirani su na 50°C tijekom 2 minute kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza nakon čega su inkubirani na 95°C kako bi se enzim uracil N-glikozilaza inaktivirala te aktivirala DNK polimeraza. Dalje je učinjeno 40 ciklusa tijekom kojih su se uzorci inkubirali: 15 sekundi na 95°C i 60 sekundi na 60°C.

Nakon učinjenog PCR-a napravljena je analiza uzoraka koristeći program Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Software. Prema količini detektiranih fluorescentnih boja 6-FAM i VIC uzorci su razvrstani na homozigote za pojedini alel (u slučaju detekcije samo 6-FAM odnosno samo VIC) i na heterozigote (u slučaju podjednake detekcije 6-FAM i VIC). Za razvrstavanje je najprije korištena automatska metoda, a u rijetkim situacijama (<1% svih analiziranih uzoraka) uzorak je razvrstan ručno prema smještaju na grafu uz dodatnu provjeru duplikata. Grafički prikaz rezultata dobivenih za svaki od analiziranih polimorfizama prikazan je na slikama 12., 13. i 14.

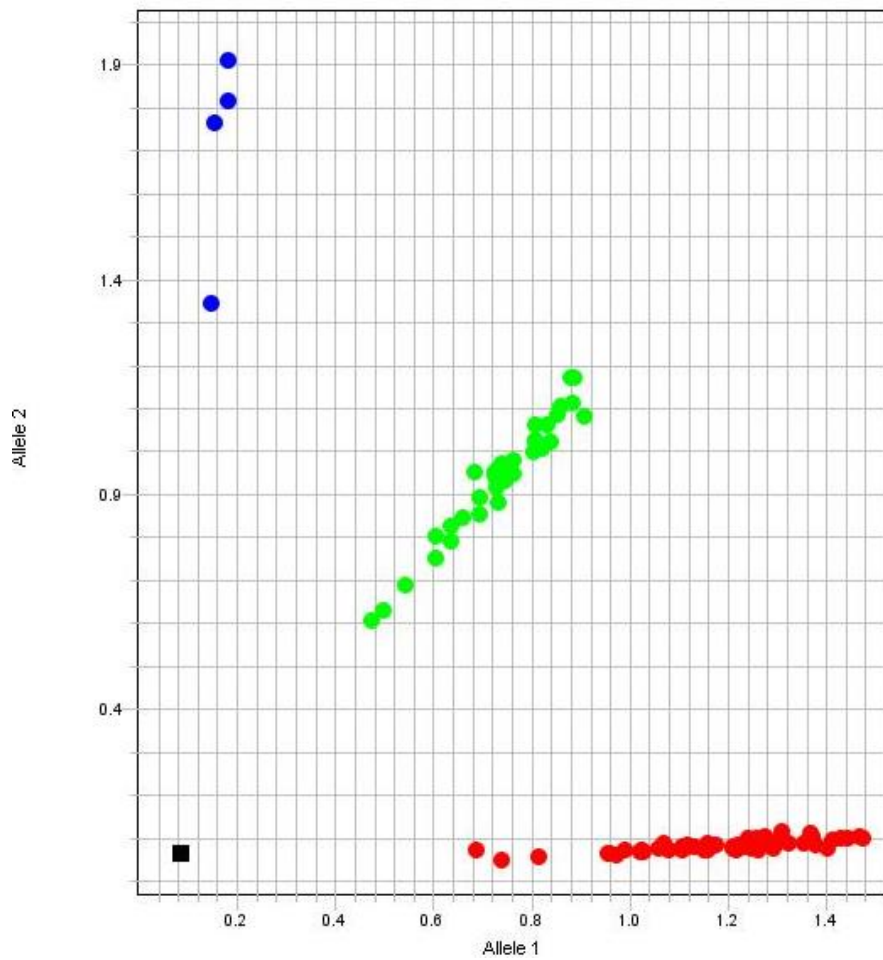


Slika 12. Alelni razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma gena *PNPLA3* rs738409 C>G. Na x-osi prikazan je alel C koji je imao fluorescentnu boju VIC, a na y-osi alel G s fluorescentnom bojom FAM. Uzorci s genotipom GG prikazani su plavim točkama, genotip CG prikazan je zelenim, a uzorci s genotipom CC crvenim točkama. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNK. Jedan uzorak (označen s x) ručno je razvrstan u heterozigote (dodatno potvrđeno analizom duplikata).

Istraživani SNP-ovi gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* odabrani su na temelju podataka iz mape haplotipova humanog genoma (HapMap) dostupne na mrežnoj stranici proizvođača (https://www.thermofisher.com/order/genome-database/?pearUXVerSuffix=pearUX2&elcanoForm=true#!/genotyping/assays/genotyping_al1/?keyword=pnpla3%20rs738409) te podataka iz NCBI SNP baze podataka dostupne na mrežnoj stranici (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Odabrani su polimorfizmi kod kojih je prisutnost slabije zastupljenog alela (engl. *minor allele frequency*, MAF) bila >20% u europskoj populaciji, a koji su temeljem prethodnih istraživanja pokazali povezanost s rizikom za razvoj alkoholne ciroze i HCC-a.



Slika 13. Alelni razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma gena *EGF* rs4444903 A>G. Na x-osi prikazan je alel A koji je imao fluorescentnu boju VIC, a na y-osi alel G s fluorescentnom bojom FAM. Uzorci s genotipom GG prikazani su plavim točkama, genotip AG prikazan je zelenim, a uzorci s genotipom AA crvenim točkama. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNK. Svi uzorci su uspješno razvrstani automatski.



Slika 14. Alelno razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma gena *NOTCH3* rs1043996 A>G. Na x-osi prikazan je alel A koji je imao fluorescentnu boju VIC, a na y-osi alel G s fluorescentnom bojom FAM. Uzorci s genotipom GG prikazani su plavim točkama, genotip AG prikazan je zelenim, a uzorci s genotipom AA crvenim točkama. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNK.

4.5. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka korišten je računalni program Statistica (verzija 10). Kontinuirane varijable prikazane su kao medijan s interkvartilnim rasponom (engl. *interquartile range*, IQR) ili kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (engl. *standard deviation*, SD) dok su za komparaciju ovih varijabli korišteni Mann-Whitney / Kruskal-Wallis test ili Student's t-test / ANOVA. Kategoričke varijable komparirane su koristeći hi-kvadrat test.

Učestalost genotipova svih polimorfizama testirana je Hardy-Weinbergovim principom odnosno jednačbom. Za analizu genotipova korišten je dominantni, recesivni, kodominantni i log-aditivni model.

Za korekciju višestruke usporedbe, izračunata je minimalna razina stope lažnog otkrivanja (Storey's q) te su rezultati s $p < 0,05$ i $q < 0,05$ smatrani statistički značajnima.

Multipla logistička regresija korištena je za procjenu nezavisnih čimbenika povezanih s nastankom alkoholne ciroze i HCC-a.

Za statističke analize korišteni su besplatni mrežno dostupni programi: SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats>) i R (A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) dok je za izradu grafičkih podataka korišten program GraphPad Prism verzija 6 za Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornija, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Demografska obilježja, laboratorijski i patološki nalazi pacijenata uključenih u istraživanje

Tijekom istraživanja uključeno je ukupno 260 pacijenata od kojih je 132 (50,8%) imalo ALD bez razvijenog HCC-a što je potvrđeno patohistološkim pregledom eksplantirane jetre prilikom transplantacije, a 128 (49,2%) pacijenata imalo je razvijeni HCC. HCC je u 121 pacijenta potvrđen patohistološkim pregledom eksplantirane jetre, a u 7 pacijenata kojima nije učinjena transplantacija, HCC je potvrđen patohistološkom analizom tkiva dobivenog biopsijom jetre.

Skupina pacijenata s HCC-om bila je nešto starija od skupine pacijenata koja nije imala HCC te je medijan dobi s interkvartilnim rasponom iznosio 61,5 (57-67,5) godina odnosno 61 (56-65) godina u skupini koja nije imala HCC. Među skupinama nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,258$, Mann-Whitneyev test za nezavisne uzorke, Tablica 2.). U objema skupinama pacijenata značajno je veći udio muškaraca te je ukupno u studiju bilo uključeno 233 (89,6%) muškaraca. Udio muških pacijenata u skupini s HCC-om bio je 91,4%, a u skupini bez HCC-a bilo je 87,9% muškaraca te nije bilo statistički značajne razlike između skupina ($p=0,351$, hi-kvadrat test, Tablica 2., Slika 15.).

Analiza laboratorijskih nalaza pokazala je da je skupina pacijenata s HCC-om imala statistički značajno veću koncentraciju AFP-a 7,3 (4,3–20,7) nmol/L (medijan s interkvartilnim rasponom) nego skupina pacijenata bez HCC-a s koncentracijom AFP-a 3,8 (2,9–5,35) ($p<0,001$, Mann-Whitneyev test). Također, skupina pacijenata s HCC-om imala je statistički značajno veću serumsku vrijednost ALT-a 32 (24–45) IU/L u usporedbi sa skupinom bez HCC-a u kojoj je vrijednost ALT-a iznosila 23 (18,5–33) IU/L ($p<0,001$, Mann-Whitneyev test). Aktivnost AST-a bila je slična između skupina te nije pronađena statistički značajna razlika: 47 (36–63) u skupini bez HCC-a u usporedbi s 50 (39-70) u skupini s HCC-om ($p=0,92$, Mann-Whitneyev test). Skupina pacijenata bez HCC-a imala je statistički značajno veću koncentraciju kreatinina 91 (66–127) $\mu\text{mol/L}$ od skupine pacijenata s HCC-om 79 (63–101) $\mu\text{mol/L}$ ($p=0,011$, Mann-Whitneyev test, Tablica 2., Slika 16.).

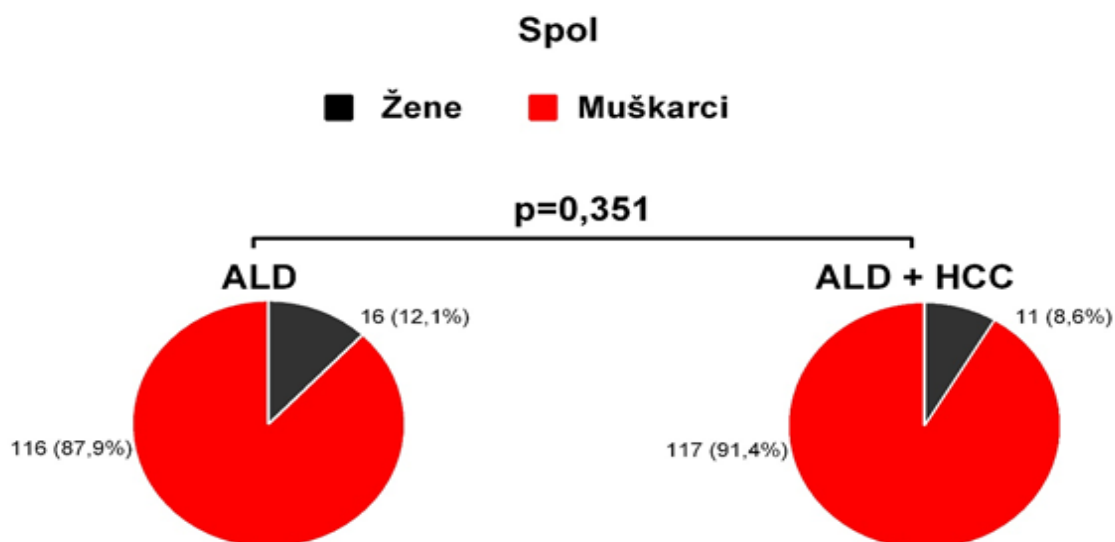
Patohistološka analiza HCC-a pokazala je da je prosječna veličina karcinoma bila $34,15 \pm 19,84$ mm. Među pacijentima s HCC-om kojima je transplantirana jetra, njih 63 (52,1%) bilo je unutar Milanskih kriterija, a 58 (47,9%) ih je bilo izvan Milanskih kriterija. Angioinvazija je bila prisutna u 45 (37,2%) slučajeva, a 76 (62,8%) ih je bilo bez angioinvazije.

Tablica 2. Demografska i klinička obilježja pacijenata uključenih u istraživanje.

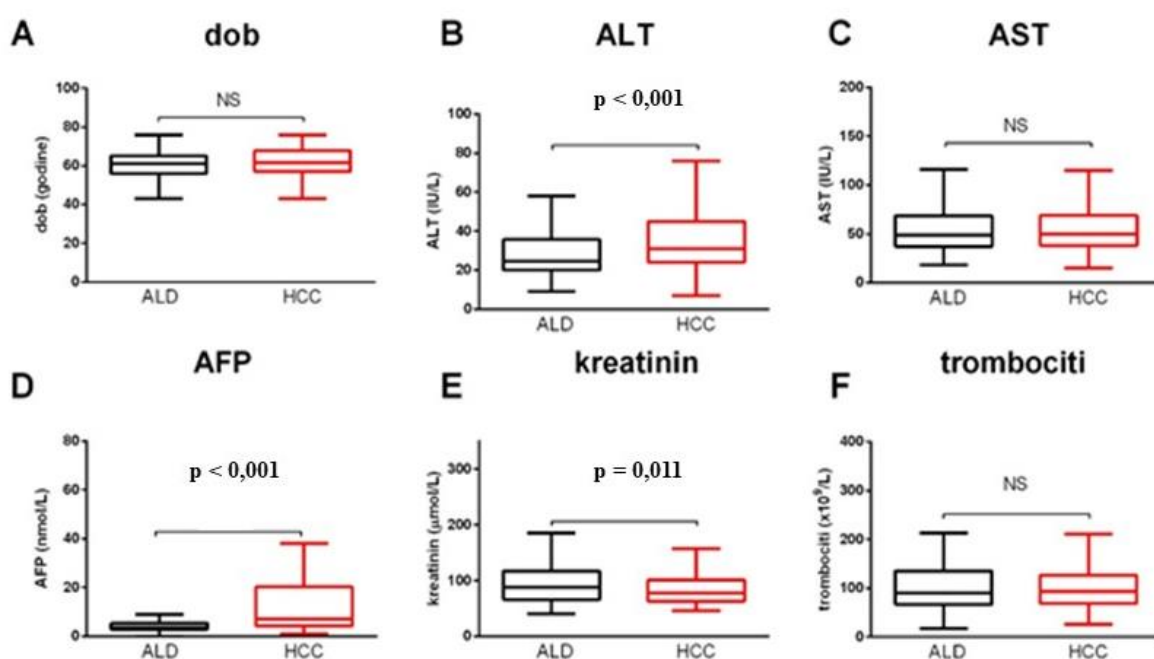
	ALD	ALD + HCC	P vrijednost
N	132	128	--
dob (godine)	61 (56-65)	61,5 (57-67,5)	0,258
spol			0,351
muški	116 (87,9%)	117 (91,4%)	
ženski	16 (12,1%)	11 (8,6%)	
ALT (IU/L)	23 (18,5–33)	32 (24–45)	<0,001
AST (IU/L)	47 (36–63)	50 (39–70)	0,92
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	91 (66–127)	79 (63–101)	0.011
Trombociti ($\times 10^9/\text{L}$)	87 (66,5–136,5)	93 (69–125)	0,84
AFP (nmol/L)	3,8 (2,9–5,35)	7,3 (4,3–20,7)	<0,001
Veličina tumora (mm)		34,15 \pm 19,84	-
Transplantacija jetre	da	121 (94,6%)	-
ne		7 (5,4%)	
Angioinvazija	da	45 (37,2%)	-
ne		76 (62,8%)	
Milanski kriteriji	unutar	63 (52,1%)	-
izvan		58 (47,9%)	

Za kontinuirane varijable podaci prikazuju medijan s interkvartilnim rasponom, a razlika između skupina ispitana je uporabom Mann-Whitneyevog testa. Za kategoričke varijable prikazani su broj pacijenata i postotak, a razlika između skupina ispitana je uporabom hi-kvadrat testa.

AFP – alfa-fetoprotein, ALD – alkoholna bolest jetre; ALT – alanin aminotransferaza, AST – aspartat aminotransferaza, HCC – hepatocelularni karcinom.



Slika 15. Prikaz zastupljenosti pacijenata u skupinama po spolu. Prikazan je broj i postotak, a p vrijednost izračunata je hi-kvadrat testom. ALD – alkoholna bolest jetre, HCC – hepatocelularni karcinom.



Slika 16. Laboratorijski nalazi pacijenata za skupinu bolesnika s alkoholnom bolesti jetre koji nisu imali HCC (crno) i za skupinu koja je imala HCC (crveno). Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost izračunata je Mann-Whitneyevim testom. ALT – alanin aminotransferaza, AST – aspartat aminotransferaza, AFP – alfa-fetoprotein, ALD – alkoholna bolest jetre, HCC – hepatocelularni karcinom.

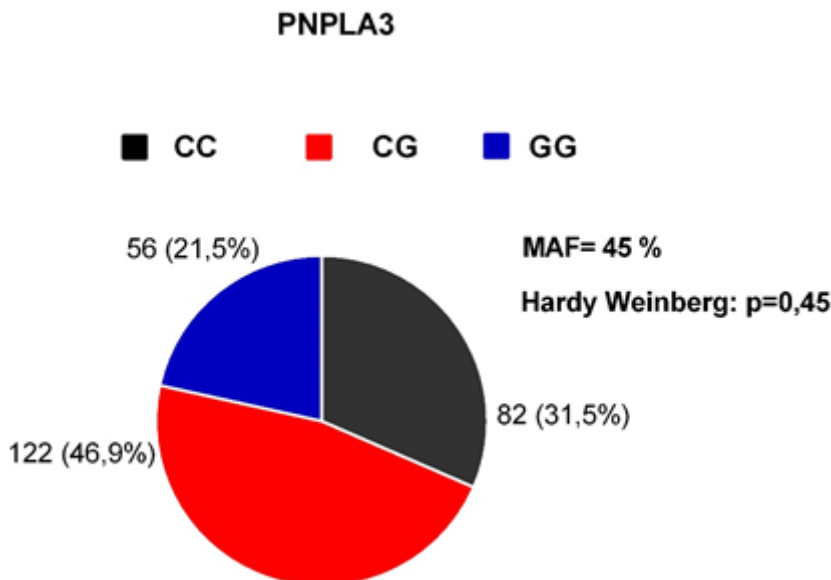
5.2. Analiza učestalosti polimorfizma gena *PNPLA3* rs738409

Prikupljena DNK uspješno je genotipizirana PCR analizom kao što je prikazano na alelnom razlikovnom grafu u Materijalu i metodama (Slika 12.).

U ukupnoj populaciji pacijenata učestalost manje zastupljenog alela (MAF) G bila je 45%, a češće zastupljenog alela C 55%. Raspodjela po genotipu pokazala je da su 82 pacijenta (31,5%) bila homozigoti za alel C (CC), dok su 122 (46,9%) pacijenta bila heterozigoti CG, a 56 (21,5%) pacijenata je imalo GG genotip. Statistički je ova raspodjela bila u skladu s pretpostavljenom Hardy-Weinbergovom raspodjelom te nije pronađeno statistički značajno odstupanje od očekivane raspodjele ($p=0,45$, Slika 17.).

U skupini pacijenata koji nisu imali HCC genotip CC je imalo 47 (35,6%) pacijenata, a u skupini s HCC-om 35 (27,3%) pacijenata. Među pacijentima bez HCC-a bilo je 68 (51,5%) heterozigota, a među pacijentima koji su imali HCC 54 (42,2%) su bili heterozigoti. Udio homozigota GG (39 pacijenata, 30,5%) bio je veći u skupini s HCC-om nego u skupini bez HCC-a (17 pacijenata, 12,9%).

U obje skupine raspodjela genotipova je bila u skladu s Hardy-Weinbergovom raspodjelom ($p=0,36$ za skupinu pacijenata bez HCC-a, odnosno $p=0,08$ za skupinu koja je imala HCC).



Slika 17. Prikaz zastupljenosti pacijenata po genotipu za polimorfizam gena *PNPLA3* rs738409. Genotip pacijenta određen je PCR-om. Prikazan je broj i postotak pacijenata. MAF – učestalost manje zastupljenog alela.

5.2.1 Povezanost polimorfizma gena *PNPLA3* rs738409 s rizikom za hepatocelularni karcinom u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, overdominantnom i log-aditivnom modelu

U analizi povezanosti rizika pojave HCC-a s pojedinim genotipom ili kombinacijom genotipova statistički značajna povezanost pronađena je u kodominantnom modelu ($p=0,002$), uz omjer izgleda za GG genotip 3,1 (1,5-6,3) u usporedbi s CC genotipom, odnosno 1,1 (0,6 -1,9) za CG genotip u usporedbi s CC genotipom (Slika 18.A).

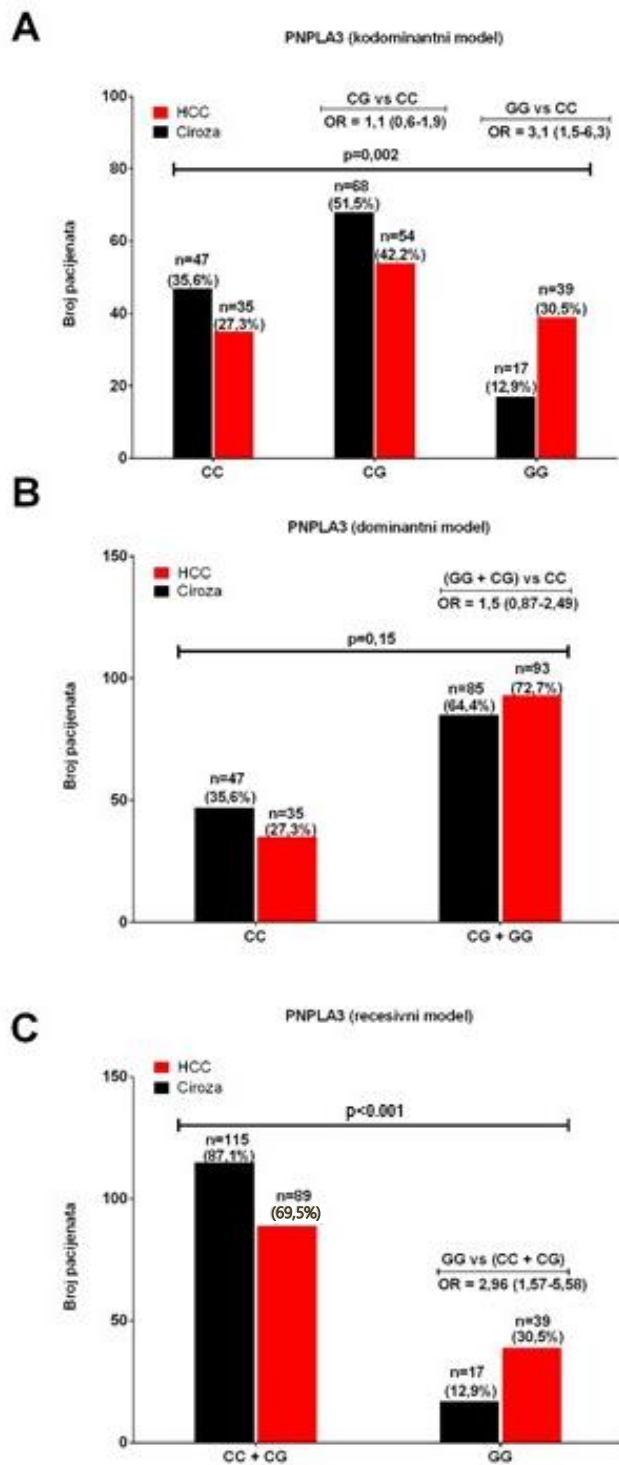
Statistički značajne razlike nije bilo u dominantnom modelu ($p=0,15$) uz omjer izgleda 1,5 (0,87-2,49) za GG/CG genotip u usporedbi s CC genotipom (Slika 18.B).

U recesivnom modelu pronađena je statistički značajna razlika ($p<0,001$) te je pronađeno da pacijenti genotipa GG imaju veći omjer izgleda za pojavu HCC-a 2,96 (1,57-5,58) od pacijenata koji su CG/CC genotipa (Slika 18.C).

Statistički značajne razlike nije bilo u overdominantnom modelu te heterozigoti nisu imali različit omjer rizika od homozigota, omjer izgleda za CG u usporedbi s CC/GG genotipom bio je 0,69 ($p=0,13$).

Analiza log-aditivnog modela pokazala je da se rizik za pojavu HCC-a povećava s pojavom G genotipa, a omjer izgleda bio je 1,66 (1,17-2,35) ($p=0,004$).

Postojanje G alela polimorfizma gena *PNPLA3* rs738409 povezano je s većim omjerom izgleda za pojavu HCC-a, a statistički značajna povezanost postoji u kodominantnom, recesivnom i log-aditivnom modelu.

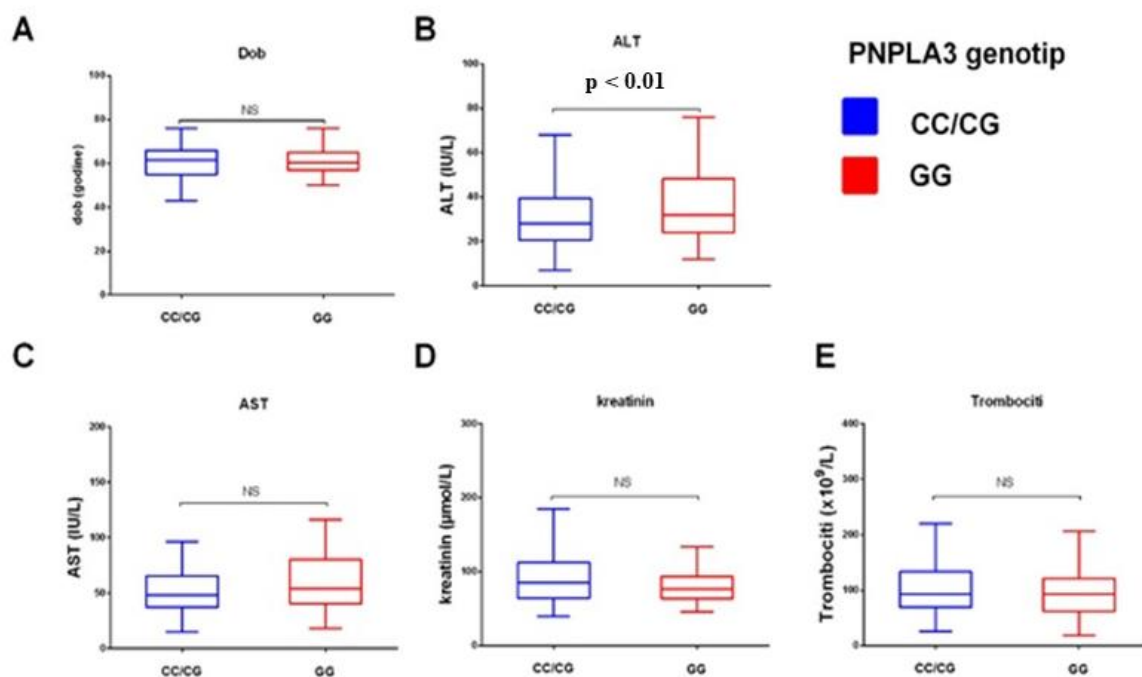


Slika 18. Prikaz omjera izgleda za razvoj HCC-a za *PNPLA3* rs738409 polimorfizam. Genotip pacijenta određen je PCR-om, a omjer izgleda i zastupljenost alela određena je SNPSTAT programom. Prikazani su rezultati za **A** kodominantni model, **B** dominantni model i **C** recesivni model. OR – omjer izgleda s 95% intervalom pouzdanosti.

5.2.2 Analiza povezanosti polimorfizma gena *PNPLA3* rs738409 s kliničkim nalazima pacijenata

U prethodnoj smo analizi pokazali da je GG genotip povezan s povećanim omjerom izgleda za pojavu HCC-a u pacijenata koji imaju završni stadij ALD-a. U ovom dijelu analize istražili smo postoji li povezanost između GG genotipa i predtransplantacijskih kliničkih nalaza te patoloških nalaza HCC-a dobivenih nakon transplantacije jetre.

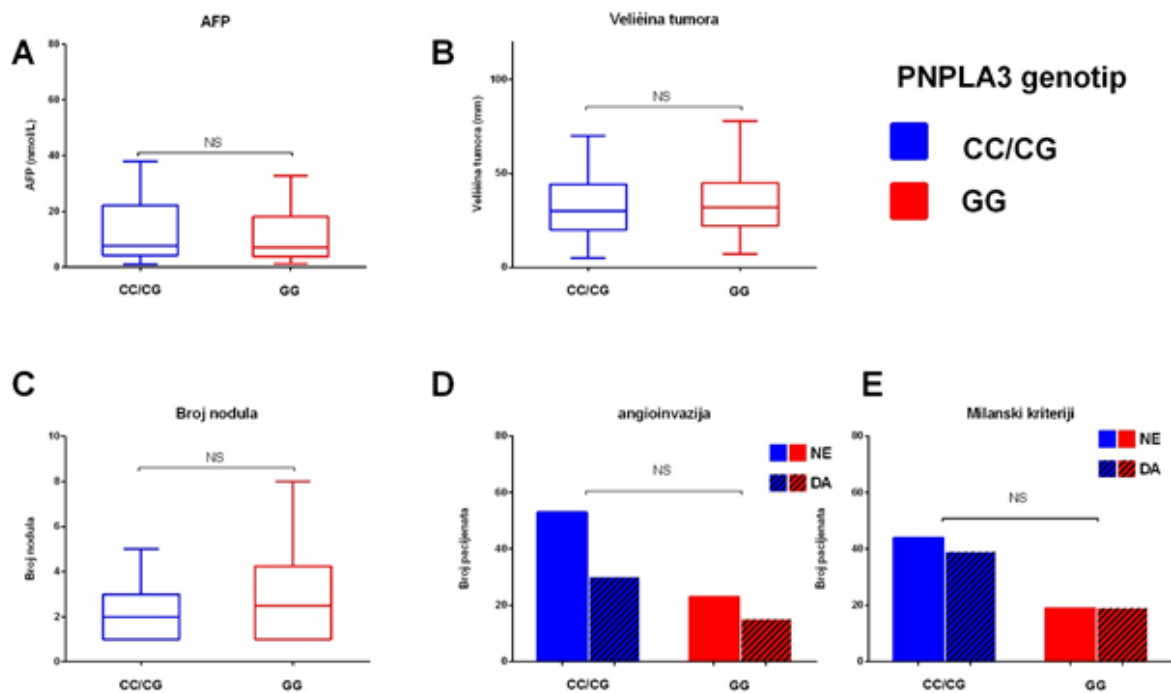
Na slici 19 pokazana je analiza povezanosti genotipa s dobi pacijenta pri transplantaciji, predtransplantacijskim serumskim vrijednostima ALT-a, AST-a, kreatinina i trombocita. Pacijenti s genotipom GG nisu se razlikovali u dobi prilikom transplantacije od CC/GC genotipa ($p > 0,05$ Mann-Whitneyev test, Slika 19.A). Izmjerena vrijednost ALT-a u GG genotipu bila je 32 (22-48) (medijan s interkvartilnim rasponom) što je statistički značajno više u odnosu na CC/GC genotip 28 (21-39) IU/L ($p < 0,01$, Mann-Whitneyev test, Slika 19.B). Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima AST-a, kreatinina niti trombocita između analiziranih genotipova ($p > 0,05$ Mann-Whitneyev test, Slika 19.C-E). Statistički značajne povezanosti nije bilo niti s pojavom dijabetesa melitusa nakon transplantacije jetre.



Slika 19. Laboratorijski nalazi pacijenata prema *PNPLA3* rs738409 genotipu. Genotip je određen PCR-om. Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost je izračunata Mann-Whitneyevim testom. ALT – alanin aminotransferaza, AST – aspartat aminotransferaza

U prethodnim smo analizama pokazali kako je G alel *PNPLA3* polimorfizma povezan s većim rizikom za pojavu HCC-a dok smo u ovom dijelu analize ispitali jesu li klinički i patohistološki nalazi HCC-a povezani s pojavnošću GG genotipa za *PNPLA3* polimorfizam. Analiza je međutim pokazala da nema statistički značajne razlike u koncentraciji AFP-a, veličini tumora i broju tumorskih lezija između genotipova (Slika 20.A-C, $p > 0,05$, Mann-Whitneyevim testom), a nije bilo razlike ni u učestalosti angioinvazije i zadovoljavanju Milanskih kriterija (Slika 20.D-E, $p > 0,05$, hi-kvadrat testom). Dodatno genotipovi se nisu razlikovali niti u ispunjavanju San Francisco kriterija prilikom transplantacije, niti po učestalosti recidiva u dvogodišnjem praćenju ($p > 0,05$, Slika 29.). Osim usporedbe, GG genotipa s kombinacijom CC/CG genotipa napravljene su i ostale usporedbe, ali niti u jednoj od analiza nije pronađena statistički značajna razlika.

Zaključno, osim nešto više serumske vrijednosti ALT-a povezane s GG genotipom, polimorfizam *PNPLA3* gena nije bio povezan s kliničkim nalazima pacijenata.



Slika 20. Laboratorijski i patohistološki nalazi pacijenata za HCC prema *PNPLA3* rs738409 genotipu. Genotip je određen PCR-om. Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost izračunata je Mann-Whitneyevim testom (A-C), odnosno broj pacijenata po skupini, a p vrijednost je izračunata hi-kvadrat testom (D-E). AFP – alfa-fetoprotein.

5.3. Analiza učestalosti polimorfizma gena *EGF* rs4444903

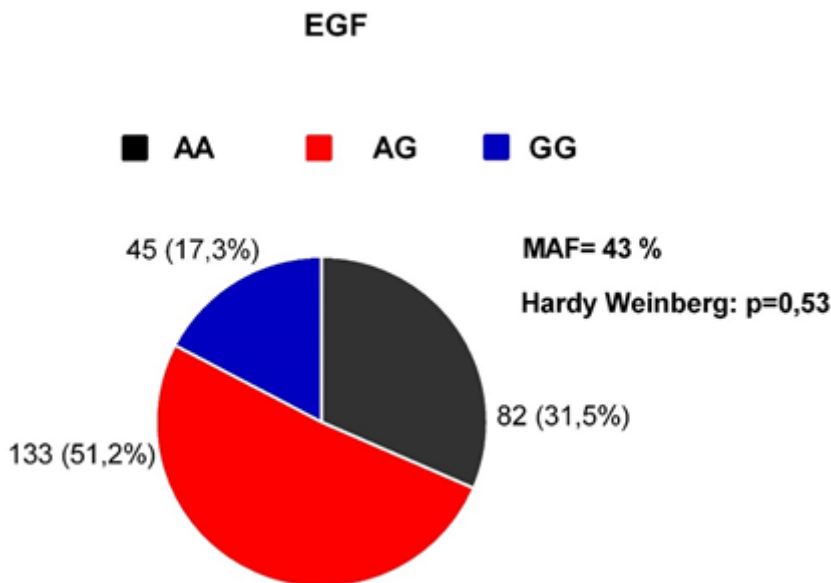
Napravljena je PCR analiza i uzorci su uspješno genotipizirani kao što je prikazano na alelnom razlikovnom grafu u Materijalu i metodama (Slika 13.).

U ukupnoj populaciji pacijenata učestalost manje zastupljenog alela (MAF) G bila je 43%, a češće zastupljenog alela A 57%.

U skupini pacijenata koji su imali HCC, MAF je bio prisutan u 48% slučajeva, a u skupini koja nije imala HCC u 38%. Od ukupnog broja pacijenata genotip GG je imalo 82 pacijenta (31,5%), a njih 133 (51,2%) su bili heterozigoti AG, dok ih je 45 (17,3%) bilo GG homozigoti. Statistički je ova raspodjela bila u skladu s pretpostavljenom Hardy-Weinbergovom raspodjelom te nije pronađeno statistički značajno odstupanje od očekivane raspodjele ($p=0,53$, Slika 21.).

U skupini pacijenata s ALD-om koji nisu imali HCC genotip AA je imalo 51 (38,6%) pacijenata, a u skupini pacijenata koji su imali HCC taj genotip je imalo 31 (24,2%) pacijenata. Pacijenti koji nisu imali HCC bili su u 61 (46,2%) slučajeva heterozigoti, a pacijenti koji su imali HCC bili su heterozigoti u 72 (56,3%) slučajeva. Među pacijentima koji nisu imali HCC udio homozigota GG (20 pacijenata, 15,2%) bio je nešto manji od udjela homozigota GG u skupini s HCC-om (25 pacijenata, 19,5%).

U obje skupine raspodjela genotipova je bila u skladu s Hardy-Weinbergovog raspodjelom ($p=0,85$ za skupinu pacijenata bez HCC-a, odnosno $p=0,21$ za skupinu koja je imala HCC).



Slika 21. Prikaz zastupljenosti pacijenata po genotipu za polimorfizam gena *EGF* rs4444903. Genotip pacijenta određen je PCR-om. Prikazan je broj i postotak pacijenata. MAF – učestalost manje zastupljenog alela.

5.3.1 Povezanost polimorfizma gena *EGF* rs4444903 s rizikom za hepatocelularni karcinom u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, overdominantnom i log-aditivnom modelu

Nakon genotipizacije napravljene su usporedbe povezanosti genskog polimorfizma za *EGF* i pojave HCC-a. U kodominantnom modelu omjer izgleda za pojavu HCC-a za GG genotip bio je nešto veći 2,1 (0,9-4,2) u usporedbi s AA genotipom (razlika ovdje nije statistički značajna jer 95% interval pouzdanosti uključuje 1). S druge strane omjer izgleda za AG genotip u usporedbi s AA genotipom bio je 1,9 (1,1-3,4), ukupno je model bio statistički značajan ($p=0,04$, Slika 22.A), ali je statistički uvjerljivija razlika pronađena u dominantnom i log-aditivnom modelu.

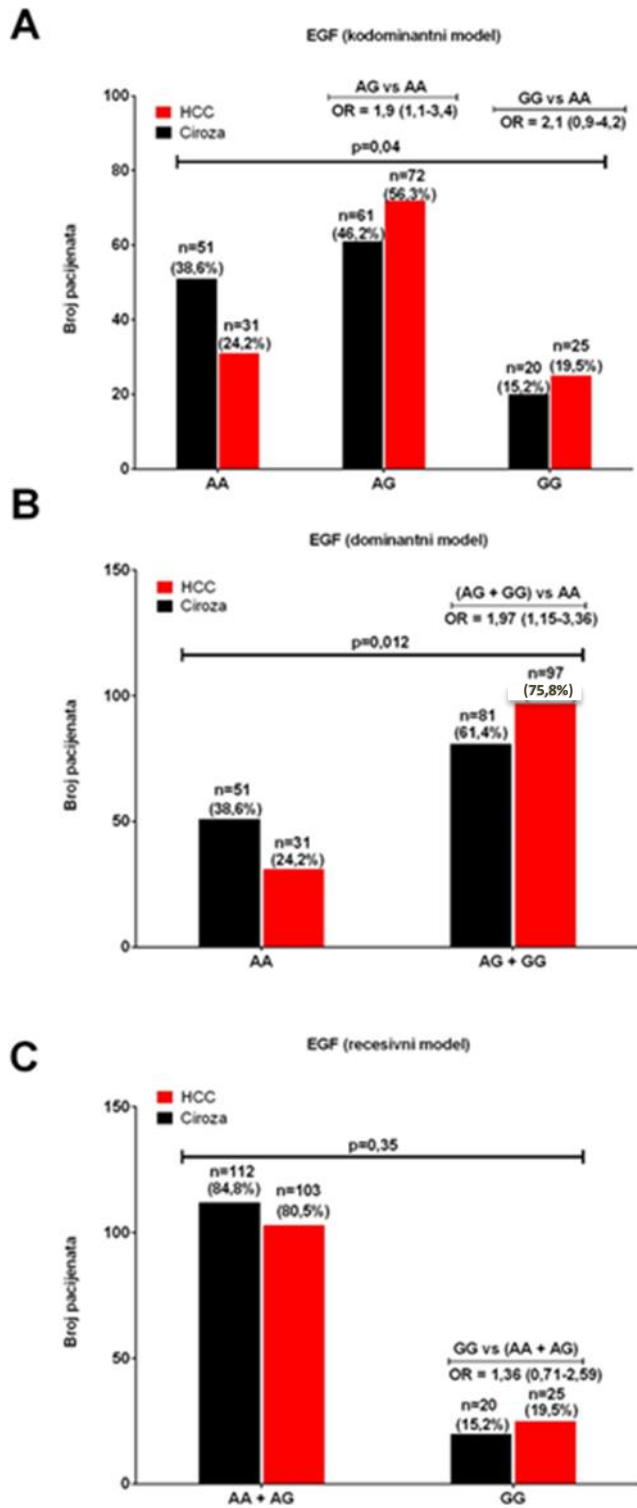
U dominantnom modelu pokazano je da je kombinacija genotipova AG/GG znatno češće zastupljena u grupi pacijenata koji imaju HCC te je 75,8% pacijenata s HCC-om bilo AG/GG genotipa, a u skupini bez HCC-a taj je genotip imalo 61,4 % pacijenata. Omjer izgleda za pojavu HCC-a za AG/GG genotip bio je 1,97 (1,15-3,36) u usporedbi s AA genotipom. Razlika je bila statistički značajna ($p=0,012$ Slika 22.B).

U recesivnom modelu, pacijenti koji su imali genotip GG imali su veći omjer izgleda za pojavu HCC-a (1,36 (0,71-2,59) od pacijenata koji su imali AG/AA genotip, ali razlika nije bila statistički značajna ($p=0,35$, Slika 22.C).

Statistički značajne razlike nije bilo u overdominantnom modelu te heterozigoti nisu imali različit omjer rizika od homozigota, omjer izgleda za AG u usporedbi s AA/GG genotipom bio je 1,55 (0,92-2,44) $p=0,13$.

Statistički značajna razlika pronađena je u log-aditivnom modelu gdje je omjer izgleda za pojavu HCC-a bio povezan s pojavom G genotipa, omjer izgleda bio je 1,50 (1,05-2,16) $p=0,026$.

Postojanje G alela polimorfizma *EGF* rs4444903 gena povezano je s većim omjerom izgleda za pojavu HCC-a, a statistički značajna povezanost postoji u kodominantnom, dominantnom i log-aditivnom modelu. Neovisnost ove povezanosti o *PNPLA3* genotipu ispitana je u završnom dijelu analize.

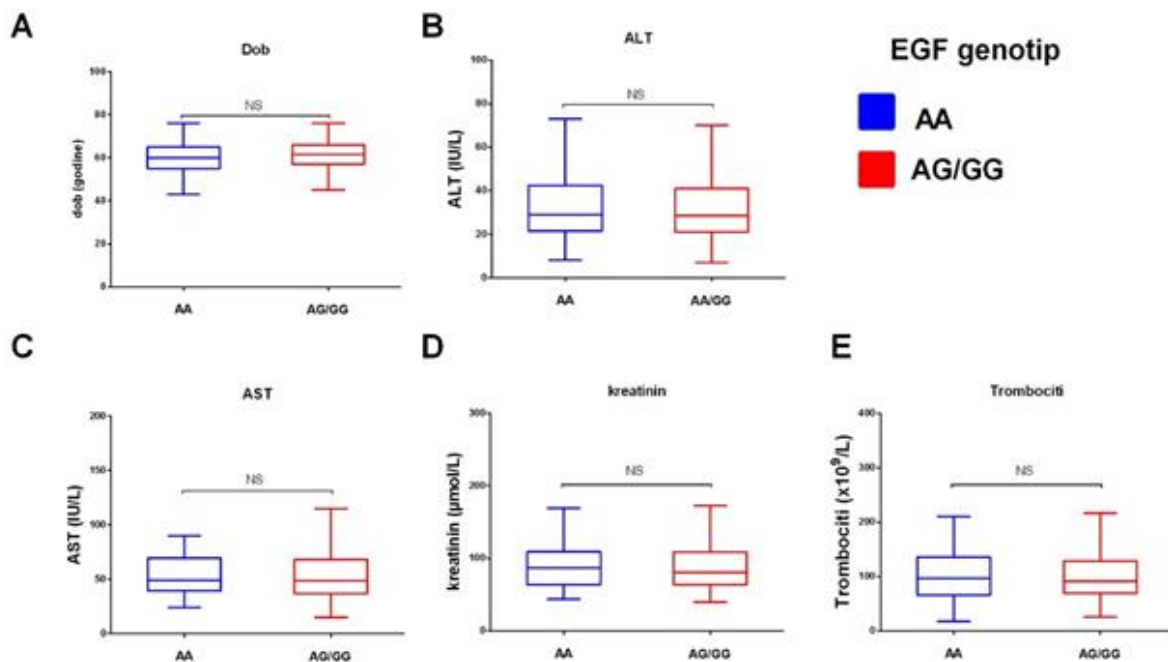


Slika 22. Prikaz omjera izgleda za razvoj HCC-a za polimorfizam gena *EGF* rs4444903. Genotip pacijenta određen je PCR-om, a omjer izgleda i zastupljenost alela određena je SNPSTAT programom. Prikazani su rezultati za **A** kodominantni model, **B** dominantni model i **C** recesivni model. OR – omjer izgleda s 95% intervalom pouzdanosti.

5.3.2 Analiza povezanosti polimorfizma gena *EGF* rs4444903 s kliničkim nalazima pacijenata

U prethodnoj smo analizi pokazali da je kombinacija AG/GG genotipa za *EGF* povezana s povećanim omjerom izgleda za pojavu HCC-a u pacijenata koji imaju završni stadij ALD-a. U ovom dijelu analize istražili smo postoji li povezanost između ove kombinacije genotipa i predtransplantacijskih kliničkih nalaza te patohistoloških nalaza HCC-a dobivenih nakon transplantacije jetre.

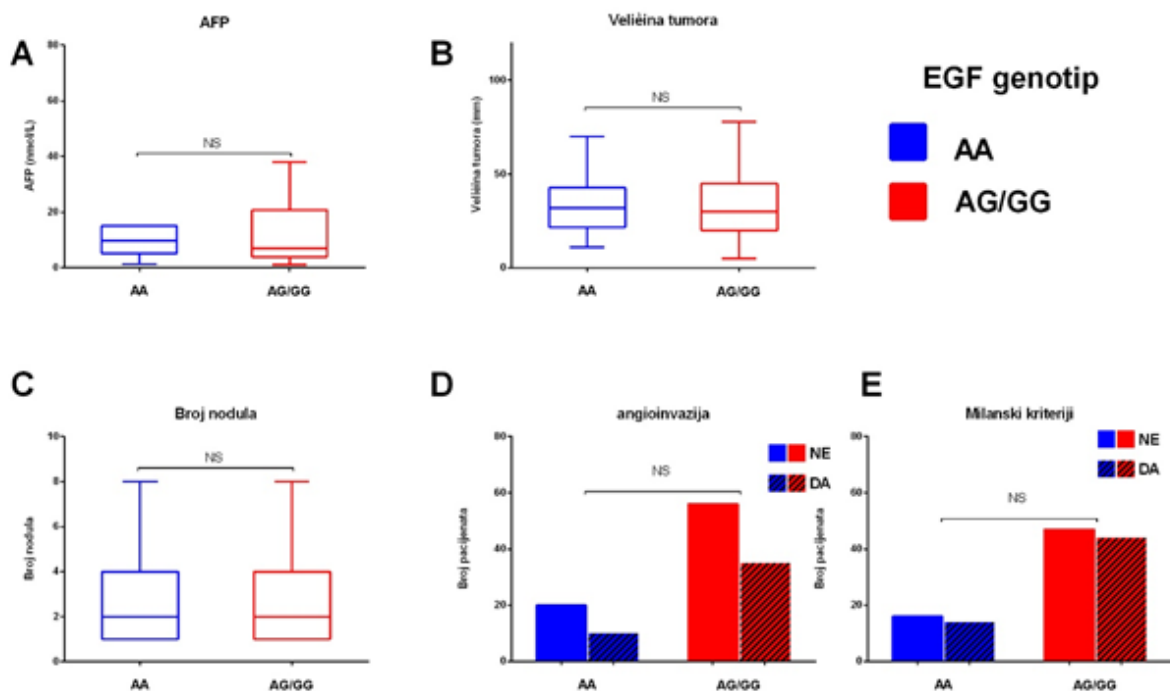
Na slici 23 pokazana je analiza povezanosti genotipa s dobi pacijenta pri transplantaciji, predtransplantacijskim vrijednostima ALT-a, AST-a, kreatinina i trombocita. Pacijenti s genotipom AG/GG nisu se statistički značajno razlikovali od pacijenata niti u jednoj od analiziranih varijabli ($p > 0,05$, Mann-Whitneyevim testom, Slika 23.A-E). Napravljene su i dodatne analize za ostale kombinacije genotipova i kliničke pokazatelje, ali nije bilo statistički značajne razlike.



Slika 23. Laboratorijski nalazi pacijenata prema *EGF* rs4444903 genotipu. Genotip je određen PCR-om. Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost je izračunata Mann-Whitneyevim testom. ALT – alanin aminotransferaza, AST – aspartat aminotransferaza.

U drugom dijelu analize ispitali smo jesu li klinički i patohistološki nalazi HCC-a povezani s pojavnošću AG/GG genotipa za *EGF* polimorfizam koji su bili povezani s većim omjerom izgleda za pojavu HCC-a. Analiza je međutim pokazala da nema statistički značajne razlike u koncentraciji AFP-a, veličini tumora i broju tumorskih lezija između genotipova (Slika 24.A-C, $p > 0,05$, Mann-Whitneyevim testom), a nije bilo razlike u učestalosti angioinvazije ni ispunjavanju Milanskih kriterija (Slika 24.D-E, $p > 0,05$, hi-kvadrat testom). Dodatno genotipovi se nisu razlikovali u ispunjavanju San Francisco kriterija prilikom transplantacije, niti po učestalosti recidiva u dvogodišnjem praćenju ($p > 0,05$, Slika 29.). Osim ove usporedbe, napravljene su i ostale usporedbe između genotipova, ali u nijednoj od analiza nije pronađena statistički značajna razlika.

Polimorfizam gena *EGF* rs4444903 povezan je s povećanim omjerom izgleda za pojavu HCC-a no nema statistički značajne povezanosti između ovog polimorfizma i predtransplantacijskih nalaza pacijenata kao niti povezanosti s kliničkim ili patohistološkim nalazima HCC-a.



Slika 24. Laboratorijski i patohistološki nalazi pacijenata za HCC prema *EGF* rs4444903 genotipu. Genotip je određen PCR-om. Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost je izračunata Mann-Whitneyevim testom (A-C), odnosno broj pacijenata po skupini, a p vrijednost je izračunata hi-kvadrat testom (D-E). AFP – alfa-fetoprotein.

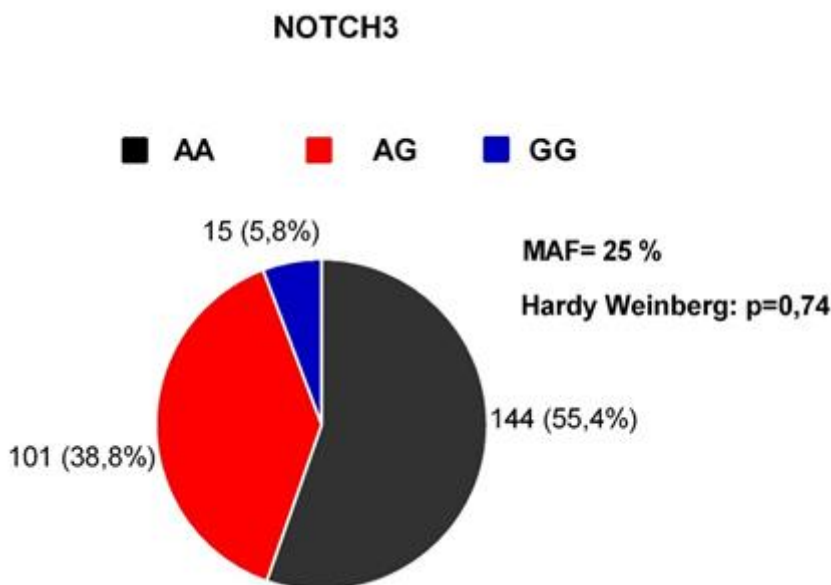
5.4. Analiza učestalosti polimorfizma gena *NOTCH3* 1043996

Prikupljena DNK uspješno je genotipizirana PCR analizom kao što je prikazano na alelnom razlikovnom grafu u Materijalu i metodama (Slika 14.). U ukupnoj populaciji pacijenata učestalost manje zastupljenog alela (MAF) G bila je 25%, a češće zastupljenog alela C 75%.

U skupini pacijenata koji su imali HCC, MAF je bio prisutan u 27% slučajeva, a u skupini koja nije imala HCC u 23%. Raspodjela po genotipu pokazala je da su 144 pacijenta (55,4%) bila homozigoti za alel A (AA), dok je 101 (38,8%) pacijent bio heterozigot genotipa AG, a 15 (5,8%) pacijenata homozigot GG genotipa. Statistički je ova raspodjela bila u skladu s pretpostavljenom Hardy-Weinbergovom raspodjelom te nije pronađeno statistički značajno odstupanje od očekivane raspodjele ($p=0,74$, Slika 25.).

U skupini pacijenata koji nisu imali HCC genotip AA je imalo 74 (56,1%) pacijenata, a u skupini pacijenata s HCC-om 70 (54,7%) pacijenata. Među pacijentima bez HCC-a bilo je 54 (40,9%) heterozigota, a među pacijentima koji su imali HCC 47 (36,7%) su bili heterozigoti. Pacijenata koji su bili homozigoti za GG alel bilo je 4 (3%) u skupini pacijenata bez HCC-a, a 11 (8,6%) u skupini s HCC-om.

U obje skupine raspodjela genotipova je bila u skladu s Hardy-Weinbergovom raspodjelom ($p=0,15$ za skupinu pacijenata bez HCC-a, odnosno $p=0,50$ za skupinu koja je imala HCC).



Slika 25. Prikaz zastupljenosti pacijenata po genotipu za polimorfizam gena *NOTCH3* rs1043996. Genotip pacijenta određen je PCR-om. Prikazan je broj i postotak pacijenata. MAF – učestalost manje zastupljenog alela

5.4.1. Povezanost polimorfizma gena *NOTCH3* rs1043996 s rizikom za hepatocelularni karcinom u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, overdominantnom i log-aditivnom modelu

U ovom dijelu analize rezultata ispitali smo postoji li povezanost *NOTCH3* rs1043996 polimorfizma s povećanim ili smanjenim izgledom pojave HCC-a u pacijenata oboljelih od ALD-a.

U kodominantnom modelu heterozigoti AG su imali omjer izgleda 0,9 (0,5-1,5) za pojavu HCC-a u odnosu na pacijente s genotipom AA, dok je omjer izgleda za pacijente genotipa GG bio 2,9 (0,9-9,6). P vrijednost modela nije bila statistički značajna ($p=0,14$, Slika 26.A).

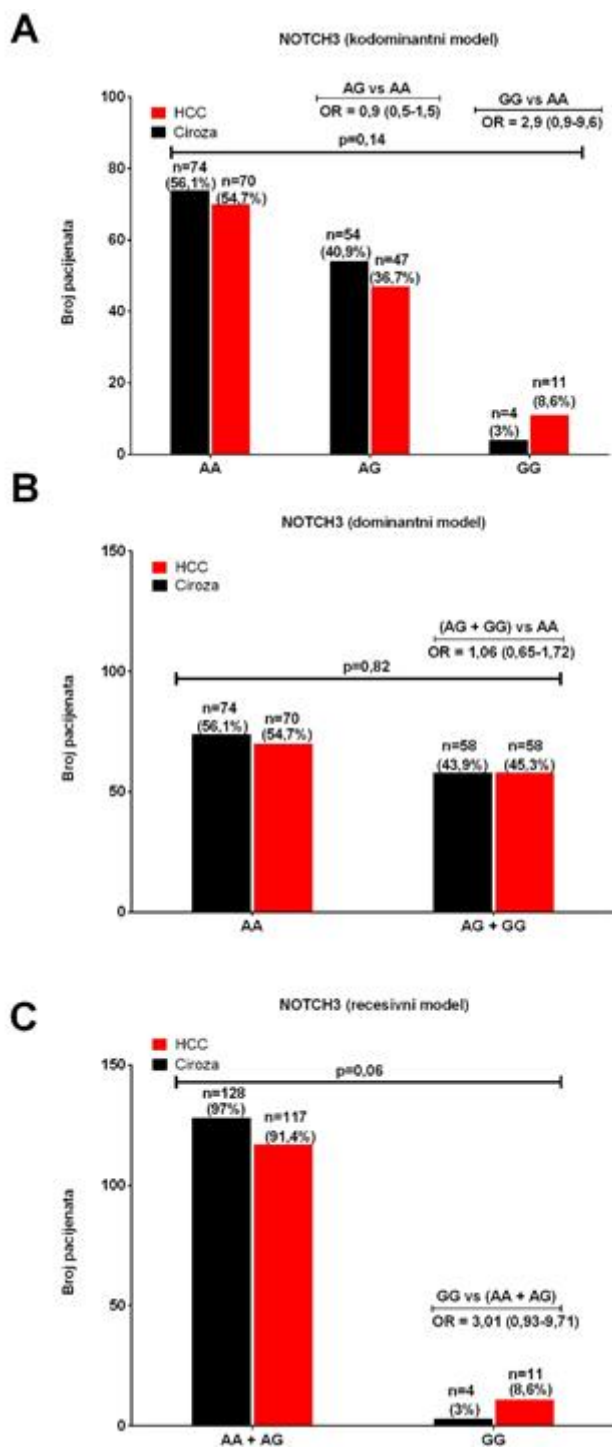
U dominantnom modelu pacijenti genotipa AG i GG su imali omjer izgleda 1,06 (0,65-1,72) za pojavu HCC-a u odnosu na pacijente koji su homozigoti za A alel. Model nije bio statistički značajan ($p=0,82$, Slika 26.B).

Statistički značajna razlika nije pronađena niti nakon analize recesivnog modela u kojem je omjer izgleda za pojavu HCC-a kod GG homozigota iznosio 3,01 (0,93-9,71) u odnosu na preostala dva analizirana genotipa ($p=0,06$, Slika 26.C).

Statistički značajne razlike nije bilo ni u overdominantnom modelu te heterozigoti nisu imali različit omjer rizika od homozigota, omjer izgleda za AG u usporedbi s AA/GG genotipom bio je 0.84 (0,51-1,38), $p=0,49$.

Slično prethodnim analizama, statistički značajna razlika nije pronađena niti analizom u log-aditivnom modelu gdje je omjer izgleda za pojavu HCC-a bio povezan s pojavom G genotipa, 1,21 (0,81-1,81), $p=0,35$.

Nakon provedenih analiza polimorfizam gena *NOTCH3* rs1043996 nije pokazao statistički značajnu povezanost s rizikom pojave HCC-a.

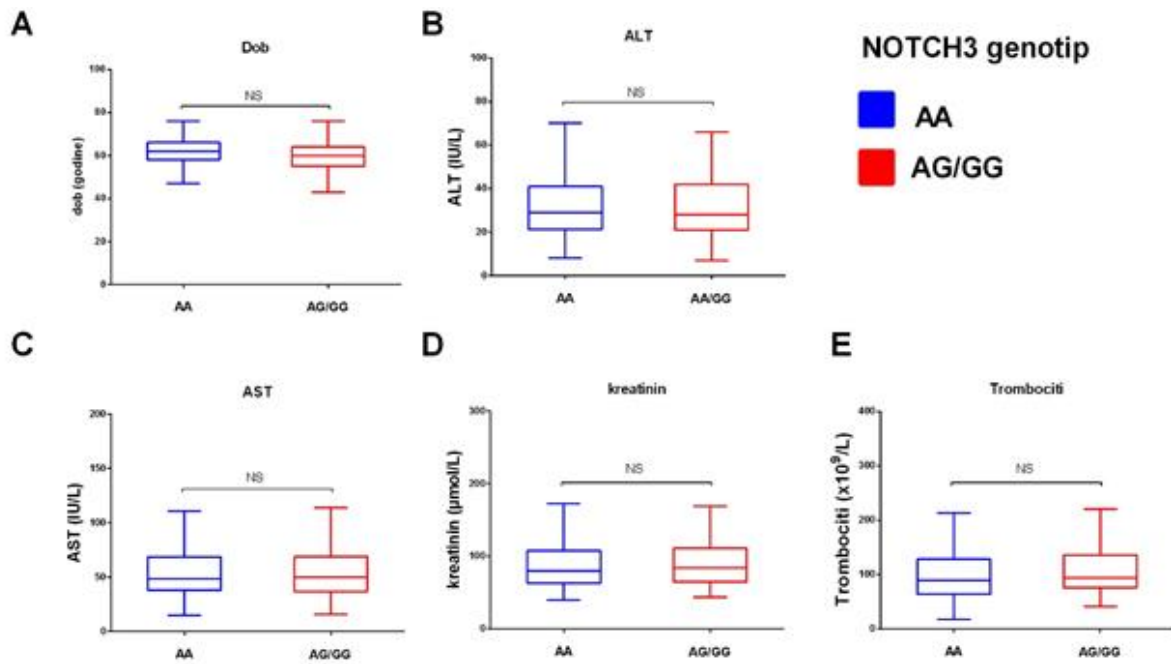


Slika 26. Prikaz omjera izgleda za razvoj HCC-a za *NOTCH3* rs1043996 polimorfizam. Genotip pacijenta određen je PCR-om, a omjer izgleda i zastupljenost alela određena je SNPSTAT programom. Prikazani su rezultati za **A** kodominantni model, **B** dominantni model i **C** recesivni model. OR – omjer izgleda s 95% intervalom pouzdanosti.

5.4.2. Analiza povezanosti polimorfizma gena *NOTCH3* rs1043996 s kliničkim nalazima pacijenata

U prethodnoj analizi pokazali smo da *NOTCH3* rs1043996 polimorfizam nije povezan s rizikom pojave HCC-a. Kako je poznato da ponekad i polimorfizmi koji nisu povezani s povećanim rizikom pojave bolesti ipak mogu imati utjecaj na kliničku sliku bolesti istražili smo postoji li povezanost između *NOTCH3* genotipa i kliničkih nalaza te patohistoloških nalaza HCC-a dobivenih nakon transplantacije jetre. Napravljena je analiza za različite kombinacije genotipova, a na slikama 27 i 28 pokazana je analiza usporedbe kombinacije AG/GG genotipa s pacijentima AA genotipa.

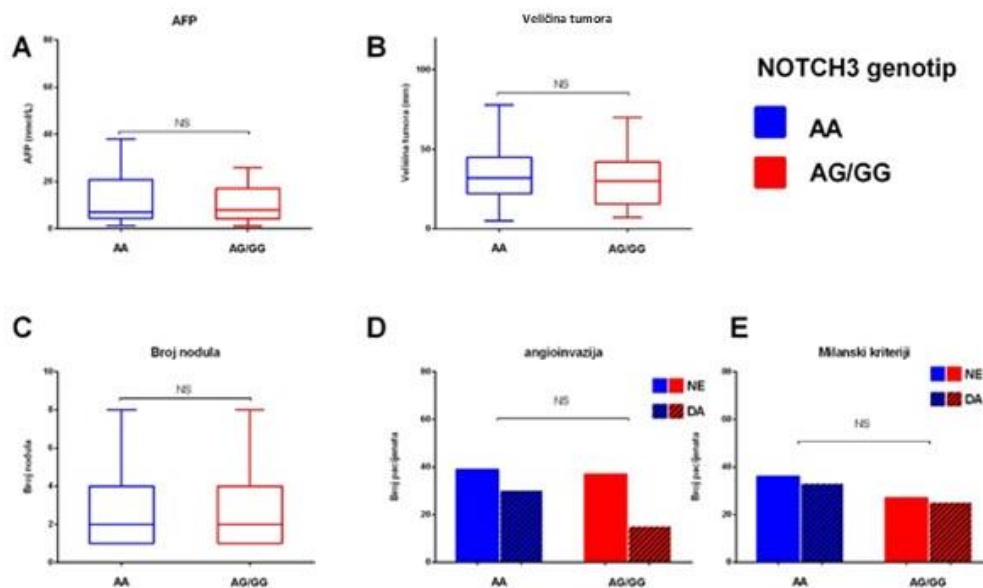
Na slici 27 pokazana je analiza povezanosti genotipa s dobi pacijenta pri transplantaciji, predtransplantacijskim vrijednostima ALT-a, AST-a, kreatinina i trombocita. Pacijenti s genotipom AG/GG nisu se statistički značajno razlikovali od GG pacijenata u dobi pacijenta pri transplantaciji, predtransplantacijskim vrijednostima ALT-a, AST-a, kreatinina i trombocita ($p > 0,05$, Mann-Whitneyevim testom slika 27.A-E). Statistički značajne povezanosti nije bilo niti s ostalim kliničkim nalazima kao ni za ostale usporedbe različitih genotipova.



Slika 27. Laboratorijski nalazi pacijenata prema genotipu za *NOTCH3* rs1043996 polimorfizam. Genotip je određen PCR-om. Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost izračunata je Mann-Whitneyevim testom. ALT – alanin aminotransferaza, AST – aspartat aminotransferaza.

Statistički značajne razlike nije bilo niti u varijablama povezanim s nalazima HCC-a te nije bilo razlike u koncentraciji AFP-a, veličini tumora, i broju tumorskih lezija između genotipova (Slika 28.A-C, $p > 0,05$, Mann-Whitneyevim testom), a nije bilo razlike u učestalosti angioin vazije, ni ispunjavanju Milanskih kriterija (Slika 28.D-E, $p > 0,05$, hi-kvadrat testom). Dodatno genotipovi se nisu razlikovali niti u ispunjavanju San Francisco kriterija prilikom transplantacije, niti po učestalosti recidiva u dvogodišnjem praćenju ($p > 0,05$, Slika 29.). Osim ove usporedbe, napravljene su i ostale usporedbe između genotipova, ali u nijednoj analizi nije pronađena statistički značajna razlika.

Polimorfizam gena *NOTCH3* rs1043996 nije povezan s predtransplantacijskim nalazima pacijenata kao niti s kliničkim ili patohistološkim nalazima HCC-a.



Slika 28. Laboratorijski i patohistološki nalazi pacijenata za HCC prema *NOTCH3* rs1043996 genotipu. Genotip je određen PCR-om. Prikazani su medijan i interkvartilni raspon, a p vrijednost izračunata je Mann-Whitneyevim testom (A-C), odnosno broj pacijenata po skupini, a p vrijednost je izračunata hi-kvadrat testom (D-E). AFP – alfa-fetoprotein.

5.5. Analiza neravnoteže vezanosti gena i analiza logističkom regresijom za procjenu neovisnosti pojedinih polimorfizama

Kako bi donijeli zaključke o međuovisnosti pojedinih genskih polimorfizama koje smo analizirali u istraživanju, u ovom smo dijelu analizirali neravnotežu vezanosti analiziranih polimorfizama (engl. *linkage disequilibrium*) te smo za polimorfizme koji su u prethodno provedenoj analizi (*PNPLA3* i *EGF*) u modelu logističke regresije provjerili jesu li neovisni prediktori pojavnosti HCC-a.

Analiza neravnoteže vezanosti gena pokazala je da ne postoji statistički značajna vezanost između pojedinih polimorfizama koje smo analizirali. U analizi povezanosti *PNPLA3* i *EGF* D koeficijent bio je 0,0051, a D' 0,026 (p=0,63). Između *PNPLA3* i *NOTCH3* polimorfizma D koeficijent bio je 0,0038, a D' 0,02700 (p=0,6685), a u analizi vezanosti *EGF* i *NOTCH3*, D koeficijent bio je 0,00251, a D' 0,0228 (p=0,794). Rezultati ove analize pokazuju da je

pojavnost ovih polimorfizama unutar analizirane populacije neovisna te da ne postoji značajna neravnoteža vezanosti gena.

U modelu logističke regresije analizirana je međusobna neovisnost polimorfizama gena *PNPLA3* i *EGF* kao prediktora za pojavu HCC-a. Analiza je pokazala njihovu međusobnu neovisnost uz omjer izgleda za *PNPLA3* GG genotip 3,07 (1,61-5,85) (p=0,001) odnosno 2,06 (1,19-3,57) p=0,01 za AG/GG kombinaciju genotipa u *EGF* polimorfizmu. Polimorfizmi za *PNPLA3* i *EGF* ostali su neovisni prediktori i nakon što je model dodatno prilagođen za spol i dob pacijenata. Nakon prilagodbe omjer izgleda za *PNPLA3* GG genotip bio je 3,10 (1,62-5,92) (p=0,001), a za *EGF* AG/GG kombinaciju genotipa 2,01 (1,16-3,51) p=0,013 (Tablica 3.).

Tablica 3. Logističko regresijska analiza.

Varijable uključene model ¹	u	b	Wald	p	OR (95% CI)	Prilagođeni model ²	
						P	OR (95% CI)
<i>PNPLA3</i> rs738409 CC/CG GG		Ref 1,12	- 11,7	- 0,001	1,00 3,07 (1,61-5,85)	- 0,001	1,00 3,10 (1,62-5,92)
<i>EGF</i> rs4444903 AA AG/GG		Ref 0,72	- 6,57	- 0,010	1,00 2,06 (1,19-3,57)	- 0,013	1,00 2,01 (1,16-3,51)

¹ u model su uključeni polimorfizmi za *PNPLA3* i *EGF*

² model je dodatno prilagođen za spol i dob pacijenta

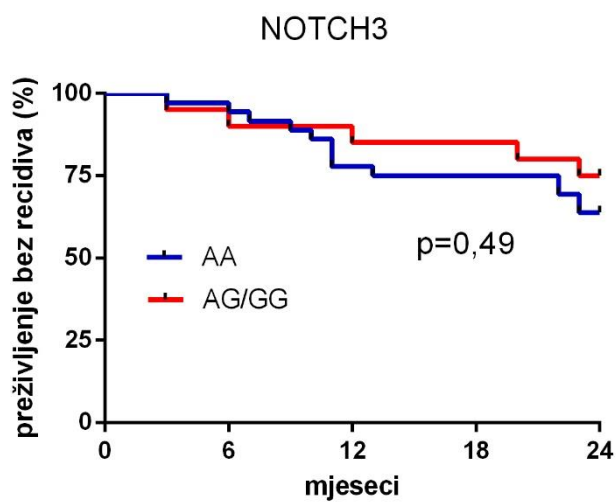
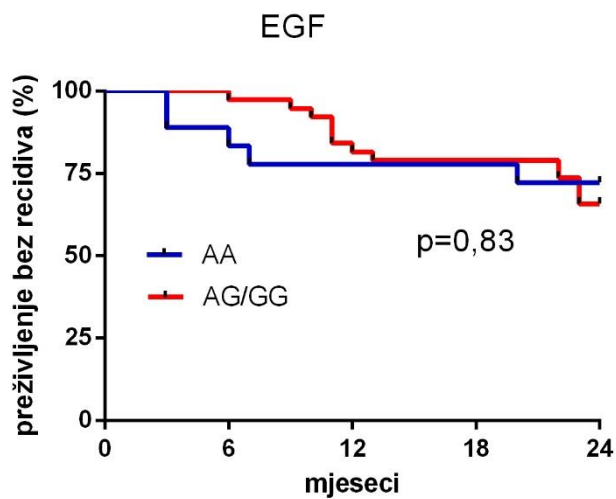
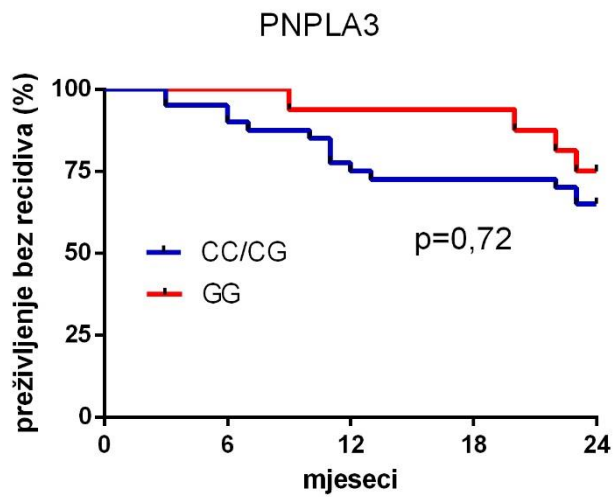
Za svaki od modela prikazan je koeficijent b s odgovarajućom Wald statističkom vrijednosti, omjer izgleda s 95% intervalom pouzdanosti i p-vrijednost.

EGF – epidermalni čimbenik rasta, OR – omjer izgleda, *PNPLA3* – protein 3 koji sadrži domenu fosfolipaze u obliku patatina, REF – referentna vrijednost

5.6. Analiza utjecaja polimorfizama primateljevih gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* na preživljenje bez recidiva hepatocelularnoga karcinoma

Nositelji rizičnog genotipa GG *PNPLA3* gena primatelja nisu se statistički značajno razlikovali ($p=0,72$) u 24-mjesečnom preživljenju bez recidiva nakon transplantacije jetre u odnosu na genotip CG/CC (Slika 29.). Također nije bilo statistički značajne razlike u 24-mjesečnom preživljenju bez recidiva nakon transplantacije jetre između genotipa AG/GG i genotipa AA primateljevog gena *EGF* ($p=0,83$) kao niti između genotipa AG/GG i genotipa AA primateljevog gena *NOTCH3* ($p=0,49$) (Slika 29.).

Zaključno, polimorfizmi primateljevih gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* ne utječu na preživljenje bez ranog recidiva HCC-a nakon transplantacije jetre.



Slika 29. Preživljenje bez recidiva HCC-a 24 mjeseca nakon transplantacije jetre. Genotipovi primateljevih gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* ne utječu na preživljenje bez recidiva 24 mjeseca nakon transplantacije jetre.

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitali smo utjecaj polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* na rizik pojave HCC-a u alkoholnoj cirozi kao i na rani recidiv HCC-a nakon transplantacije jetre. Ovo je prvo sistematsko istraživanje utjecaja genetskih čimbenika rizika na razvoj HCC-a u jugoistočno-europskoj populaciji gdje je alkoholna ciroza jedna od vodećih indikacija za transplantaciju jetre.

Polimorfizmi pojedinog nukleotida predstavljaju najčešće genetske varijacije u genomu koje su odgovorne za nastanak i progresiju HCC-a (127). Važno je naglasiti da SNP-ovi pokazuju specifičnu distribuciju za pojedine regije i rase (70, 128). Fenotipske razlike pojedinih HCC-ova povezane su s određenim brojem genetskih ili epigenetskih promjena kritičnih onkogenih ili tumor supresorskih gena, pri čemu i sam mikrookoliš ima značajan utjecaj na karcinogenezu (129, 130).

Prepoznavanje pacijenata koji su u riziku za pojavu HCC-a te njegovo rano otkrivanje jedan je od ključnih kliničkih izazova danas. Određivanje rizičnih polimorfizama može pomoći u ranijoj dijagnozi i boljem praćenju HCC-a kod pacijenata koji se nalaze u završnom stadiju ALD-a. Pacijenti s GG genotipom za *PNPLA3* u riziku su za razvoj neželjenih događaja kao što su brža progresija jetrene bolesti, razvoj ciroze i HCC-a što utječe na daljnje intervencije (74, 96, 131, 132, 133). Genotipizacija *PNPLA3* polimorfizma pokazala se korisnom i za stratifikaciju rizika kod kandidata za transplantaciju jetre budući da oni s ALD-om i HCC-om imaju kraće preživljenje čime bi mogli imati korist od prioritiziranja statusa na listi (96).

G alel *PNPLA3* gena smatra se glavnim predisponirajućim čimbenikom za progresiju bolesti prema fibrozi i cirozi posebice u alkoholnoj i nealkoholnoj bolesti te za pojavu HCC-a (135, 136, 137). Do sada nismo imali podatke o učestalosti G alela među hrvatskim pacijentima oboljelim od ALD-a kao ni o riziku za pojavu HCC-a povezanim s njegovom pojavnosti. U ovom istraživanju pokazali smo da je G alel *PNPLA3* polimorfizma prisutan u više od 60% pacijenata oboljelih od alkoholne ciroze, a njih 12,9% homozigoti su za G alel. Također smo pokazali da je G alel rizični čimbenik za razvoj HCC-a kod pacijenata s alkoholnom cirozom uz omjer izgleda 2,96 (1,57–5,58) za pacijente s GG genotipom. Naši rezultati sukladni su rezultatima koji su do sada objavljeni na drugim bliskim europskim populacijama, primjerice na talijanskoj gdje je G alel prisutan u 73% pacijenata s alkoholnom cirozom, a GG genotip

povezan s rizikom pojave HCC-a (omjer izgleda: 2,2 (1,03-4,68)) (134). Nažalost, još uvijek ne postoje podaci za ostale populacije u našem okruženju.

Iako GG homozigoti imaju najveći rizik za razvoj HCC-a, kada smo analizirali utjecaj GG genotipa u usporedbi s CC/CG genotipom na karakteristike tumora – razinu AFP-a, veličinu tumora, broj tumorskih lezija i prisutnost angioinvazije, GG genotip nije bio povezan niti s jednom od navedenih karakteristika. Naše istraživanje na tragu je studije azijske populacije pacijenata s predominantno virusom etiologijom jetrene bolesti gdje nije nađena povezanost rizičnog GG genotipa s laboratorijskim i tumorskim karakteristikama niti s ukupnim preživljenjem (138). U obje studije, našoj i tajlandskoj, dakle broj i veličina lezija nisu bile povezane s prisutnošću GG genotipa.

S druge strane, europska studija na talijanskoj populaciji pokazala je da je GG genotip *PNPLA3* u skupini s HCC-om i ALD/NAFLD-om povezan s mlađom dobi kod dijagnoze, odnosno kraćim vremenskim tijekom od pojave ciroze do razvoja HCC-a, većim brojem tumorskih lezija te višim Edmondsonovim histološkim gradusom (139). Povezanost s histološkim gradusom temeljena je na relativno malom uzorku, svega 25% pacijenata od čega je njih 10 imalo HCC i ALD stoga bi ovaj utjecaj trebalo dodatno potvrditi na većem uzorku. S obzirom da je naše istraživanje bilo retrospektivno i da su uključeni pacijenti s već potvrđenim HCC-om, sam dizajn studije nije omogućio istražiti povezanost *PNPLA3* s vremenom progresije ciroze do HCC-a. Kada smo usporedili skupinu s i bez HCC-a, nije bilo statistički značajne razlike u dobi bolesnika. Istraživana populacija sličnija je našoj s obzirom da se radi o europskoj populaciji te je uključila veći broj ispitanika, njih 80 s ALD-om i HCC-om. Iako su Valenti i sur. pokazali povezanost *PNPLA3* s brojem tumorskih lezija, to isto nije dokazano u našem istraživanju gdje je broj lezija temeljen na histološkom nalazu što može biti relevantnije u odnosu na morfološke metode. Konačni odgovor na pitanje o povezanosti *PNPLA3* s brojem tumorskih lezija vjerojatno će se razviti kasnije, nakon metaanalize većeg broja studija.

Analizom laboratorijskih podataka pronašli smo višu vrijednost ALT-a kod GG homozigota za *PNPLA3* gen u odnosu na CC/CG genotip. Ako to usporedimo s rezultatima prethodnih istraživanja, u tajlandskoj populaciji genotip nije bio povezan s vrijednostima ALT-a (138). Povezanost *PNPLA3* s višim vrijednostima ALT-a nađena je kod NAFLD pacijenata podrijetlom iz Latinske Amerike, a povezuje se s višim stupnjem steatoze i upale u jetri (71). Rezultati metaanalize ukazuju da je povezanost *PNPLA3* i višeg ALT-a prisutna kod

adolescenata dok za odrasle nije dokazana zbog inkonzistentnih i heterogenih podataka. G alel povezuje se također s povišenim sadržajem masti u jetri te posljedično povišenim vrijednostima ALT-a (140). Naša populacija razlikuje se po dobi i etiologiji bolesti te činjenici da se radilo o pacijentima s HCC-om u uznapredovaloj fazi ALD-a odnosno cirozi što podrazumijeva izostanak upale koja bi mogla biti povezana s višim ALT-om. S druge strane, nismo evaluirali prisutnost komponenti metaboličkog sindroma i steatoze koja bi mogla doprinosti povišenim vrijednostima ALT-a.

Naše istraživanje bilo je retrospektivno i uključilo je pacijente koji su transplantirani zbog HCC-a, stoga nije evaluirano vrijeme provedeno na listi do transplantacije niti preživljenje. Također, svi uključeni pacijenti su već imali etabliranu alkoholnu cirozu, stoga nije evaluirana brzina progresije bolesti. Prema nekim istraživanjima *PNPLA3* povećava rizik za relaps konzumacije alkohola, stoga je koristan marker za prepoznavanje skupine pacijenata koja će imati korist od uključivanja u programe liječenja ovisnosti ili trajnog psihijatrijskog praćenja (141). Iako su svi pacijenti uključeni u istraživanje predtransplantacijski evaluirani od strane psihijatra te su ostvarili apstinenciju od najmanje 6 mjeseci, posttransplantacijski nisu sustavno uključeni u programe koji bi im mogli pomoći u održavanju apstinencije. Također, u našem istraživanju nije praćen utjecaj donorskih polimorfizama na posttransplantacijske događaje što bi bilo korisno istražiti u budućim istraživanjima. Prema podacima iz literature *PNPLA3* gen donora mogao bi utjecati na razvoj steatoze presadka i NAFLD-a (142).

Dosadašnja saznanja ukazuju na moguću korist kliničke primjene genetskog testiranja polimorfizma *PNPLA3* kod bolesnika s NAFLD-om dok se u kontekstu ALD-a *PNPLA3* navodi kao rizični čimbenik ali nema dovoljno jasnih preporuka za rutinsko genetsko testiranje niti moguću korist u ALD-u (133, 140, 143). Ipak, još uvijek niti u europskim niti u hrvatskim smjernicama za dijagnozu i liječenje NAFLD-a, nema jasnih preporuka za rutinsko genetsko testiranje na polimorfizam *PNPLA3* (144, 145). Iako je *PNPLA3* dominantni genetski čimbenik rizika za cijeli spektar jetrenih bolesti, u GWAS studijama identificirani su i dodatni polimorfizmi (*TM6SF2*, *MBOAT7*, *HSD17B13*) koji pridonose riziku za ALD i HCC (77, 78). S druge strane, naknadno provedene studije ističu da samo postojanje određenih SNP-ova nije dovoljno za objašnjenje fenotipa određene bolesti nego u obzir treba uzeti i interakcije među pojedinim genima, SNP-posredovanim signalnim putevima, regulacijskim mehanizmima ali i okolišnim čimbenicima (128).

Kako bismo istražili mogu li polimorfizmi koji utječu na različite mehanizme u patogenezi HCC-a doprinosti riziku za razvoj HCC-a u alkoholnoj cirozi, uz polimorfizam gena *PNPLA3* ispitali smo utjecaj polimorfizama gena *EGF* i *NOTCH3*.

Za polimorfizam gena *EGF* rs4444903 dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost s rizikom za razvoj HCC-a u europskoj i azijskoj populaciji s dominantno virusnom etiologijom jetrene bolesti (103, 106, 146, 147). *EGF* ima važnu ulogu u regeneraciji jetre te patogenetsku ulogu u malignoj transformaciji i nastanku tumora (58). Osim u HCC-u, *EGF* je povišeno eksprimiran u cirozi dok je u fazi kompletne ciroze ekspresija *EGF*-a snižena (135). Pokazano je da pacijenti s cirozom i HCC-om te genotipom GG imaju višu ekspresiju *EGF*-a u serumu i tkivu jetre te su podložniji progresiji bolesti u odnosu na one s genotipom AA (148, 149). G alel odgovoran je za 2,3-2,9 puta viši rizik za pojavu HCC-a u odnosu na A alel koji ima protektivno djelovanje (105, 110).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su genotipovi AG i GG povezani s rizikom za pojavu HCC-a u našoj populaciji odnosno da G alel doprinosi većem riziku za pojavu HCC-a (OR 1,5). Kako je G alel u ranijim studijama povezan s većom ekspresijom *EGF*-a, možemo pretpostaviti da povećana ekspresija *EGF*-a doprinosi karcinogenezi, iako samu proteinsku ili gensku ekspresiju *EGF*-a nismo određivali (102, 106). Istraživanje Yuan i sur. na neazijskoj skupini pacijenata iz Los Angelesa pokazalo je da genotip GG/AG uz konzumaciju > 3 alkoholna pića dnevno povećava rizik za pojavu HCC-a (OR 3,44) (148). Uz naše istraživanje, u Europi su do sada samo Tanabe i sur., u podanalizi svoje studije ispitali povezanost polimorfizma *EGF* s pojavom HCC-a u alkoholnoj cirozi na uzorku od 121 francuska pacijenta od kojih je 44 imalo HCC. Pokazali su da postoji povećan rizik pojave HCC-a kod pacijenata s G alelom, međutim za razliku od naše studije, nisu paralelno istražili i *PNPLA3* polimorfizam za procjenu neovisnosti rizika povezanih s ova dva polimorfizma (110). Naše istraživanje pokazalo je da je rizik povezan s *EGF* polimorfizmom neovisan o *PNPLA3* polimorfizmu, a dodatni doprinos jest u činjenici da je uključilo najveći broj pacijenata južno-europskog podrijetla s histološki dokazanim HCC-om i alkoholnom cirozom.

Kada smo analizirali utjecaj *EGF* na laboratorijske nalaze i histološke nalaze HCC-a, nije bilo razlike između genotipa AG/GG i genotipa AA. Naši rezultati usporedivi su s rezultatima Yoshiya i sur. na pacijentima s hepatitis C uzrokovanim HCC-om gdje genotip nije utjecao na laboratorijske (vrijednosti AFP-a, AST-a i ALT-a) i tumorske (veličina tumora i broj lezija)

karakteristike (149). Nešto su drugačiji rezultati Dayyeh i sur. koji su temeljem razlika u kliničkim i laboratorijskim parametarima (dob spol, pušački status, vrijednosti ALP-a i trombocita) uz genotip *EGF* predložili model koji stratificira pacijente u niski, srednji i visoki rizik za pojavu HCC-a (150). Za razliku od *PNPLA3* koji je povezan s cijelim spektrom ALD-a i rizikom za HCC, *EGF* je povišeno eksprimiran u cirozi i rizični je čimbenik za pojavu HCC-a stoga bi mogao dodatno doprinijeti identifikaciji pacijenata u uznapredovaloj fazi alkoholne bolesti koji ujedno imaju i najveći rizik za razvoj HCC-a. Kako smo već spomenuli, naši podatci dobiveni logističkom regresijom pokazuju da je *EGF* genotip neovisno povezan s rizikom pojave HCC-a u odnosu na *PNPLA3* genotip pa je moguće da bi se genotipizacijom za oba polimorfizma mogla postići bolja stratifikacija.

Većina istraživanja analizirala su samo povezanost *EGF* polimorfizma s rizikom za HCC (103, 106, 147) dok je u istraživanju Kinga i sur. polimorfizam *EGF* bio povezan s kliničkim pogoršanjem i progresijom jetrene bolesti prema cirozi (109). Slično je i opažanje na talijanskim pacijentima s HCV infekcijom gdje je polimorfizam *EGF* bio povezan s višim stupnjem fibroze kod mlađih pacijenata zbog čega bi mogao biti čimbenik koji pospješuje napredovanje bolesti (134). Naše retrospektivno istraživanje dakako navedno nije moglo istražiti.

S obzirom da nismo našli povezanost rizičnog genotipa AG/GG s tumorskim karakteristikama (brojem i veličinom tumora, prisutnošću angioinvazije, tumorom izvan Milanskih kriterija, ranim recidivom) koje bi mogle utjecati na lošiju prognozu čini se da je i u našoj populaciji polimorfizam *EGF* povezan samo s rizikom za pojavu HCC-a.

Za razliku od polimorfizma *PNPLA3* za koji nije poznat točan mehanizam kojim utječe na hepatokarcinogenezu, polimorfizmi gena *EGF* i *NOTCH3* predstavljaju česte alteracije signalnih puteva važnih za karcinogenezu. *NOTCH3* gen dio je Notch signalnog puta koji ima ključnu ulogu u diferencijaciji stanica te nastanku i progresiji HCC-a (121, 150, 151). Usprkos tome, polimorfizmi *NOTCH* gena do sada su istraživani u svega nekoliko studija na pacijentima s HCC-om i HBV cirozom (126, 152, 153). U analizi Qin i sur. pokazano je da od 2040 genotipiziranih SNP-ova na 264 gena Notch signalnog puta, nakon multivarijantnih analiza i validacije, njih 50-ak je bilo statistički značajno od čega su samo tri identificirana kao nezavisni funkcionalni polimorfizmi povezani s preživljenjem pacijenata s hepatitis B uzrokovanim HCC-om (152). Ova analiza pokazuje da bez obzira na velik broj identificiranih polimorfizama, tek manji broj ima određeni klinički značaj.

Naše istraživanje po prvi je puta ispitalo utjecaj polimorfizma *NOTCH3* rs1043996 gena na rizik za pojavu HCC-a u europskoj populaciji bolesnika s alkoholnom cirozom pri čemu nismo pronašli statistički značajnu povezanost.

Prethodno je polimorfizam *NOTCH3* rs1043996 istraživao samo u jednoj kineskoj studiji u kojoj je genotip AA pokazao protektivno djelovanje te povezanost s duljim ukupnim preživljenjem kod pacijenata s hepatitis B povezanim HCC-om (126). Dizajn naše studije nije omogućio istražiti utjecaj *NOTCH3* na ukupno preživljenje.

Izostanak povezanosti polimorfizma *NOTCH3* s rizikom pojave HCC-a u našoj populaciji može se objasniti samim karakteristikama populacije i etiologijom jetrene ciroze. U oba istraživanja HCC je histološki dokazan dok je analiza *NOTCH3* polimorfizma u istraživanju Yu i sur. učinjena iz tumorskog tkiva u kojem je ekspresija *NOTCH3* bila značajno viša u odnosu na netumorsko. Navedeno je u skladu s ranijim dokazima da je *NOTCH3* gen povišeno eksprimiran u 78% HCC-a (154). Povišena ekspresija *NOTCH3* u tumorskom tkivu bila je povezana s ukupnim preživljenjem te preživljenjem bez recidiva. S druge strane, čimbenici koji su povećavali rizik za smrtni ishod kod bolesnika s *NOTCH3* AG/GG genotipom nisu nužno bili vezani uz sam tumor (dob > 45 godina, alkohol, izostanak ciroze, tumorska tromboza portalne vene, regionalna invazija). U analizi histoloških uzoraka HCC-a nakon hepatektomije Hu i sur. dokazali su povišenu ekspresiju *NOTCH3* gena koja je bila povezana s veličinom i brojem tumora, stadijem tumora i kraćim preživljenjem (155). Za razliku od navedenog, u našem istraživanju polimorfizam *NOTCH3* nije bio povezan s nijednom tumorskom karakteristikom (broj i veličina tumora, vrijednosti AFP-a, prisutnost angioinvazije, tumor izvan Milanskih kriterija) no glavna razlika u studijama je u činjenici da smo ispitivali utjecaj *NOTCH3* polimorfizma, a ne njegovu ekspresiju u tumorskom tkivu. Izostanak povezanosti uočena je i u istraživanju Shi i sur. na pacijentima s karcinomom pluća gdje je proteinski izražaj *NOTCH3* identificiran kao čimbenik koji doprinosi agresivnijem fenotipu tumora dok *NOTCH3* polimorfizmi nisu imali nikakav utjecaj (156). U budućim istraživanjima o povezanosti *NOTCH3* s rizikom pojave HCC-a u alkoholnoj cirozi jetre bi stoga bilo bolje usmjeriti pozornost na proteinski izražaj.

Nakon pojedinačnih analiza, polimorfizmi gena *PNPLA3* i *EGF* identificirani su kao čimbenici rizika za pojavu HCC-a u hrvatskoj populaciji pacijenata s alkoholnom cirozom. Analizom povezanosti pojavnost polimorfizama gena *PNPLA3* i *EGF* u našoj populaciji bila je neovisna

dok je analiza logističkom regresijom pokazala da su GG genotip *PNPLA3* i AG/GG genotip *EGF* gena međusobno neovisni čimbenici. Naši rezultati djelomično potvrđuju hipotezu istraživanja budući da su polimorfizmi gena *PNPLA3* i *EGF* rizični čimbenici za pojavu HCC-a dok za polimorfizam *NOTCH3* gena nismo dokazali povezanost.

Budući da je naše istraživanje uključilo pacijente s HCC-om liječene transplantacijom jetre, osim povezanosti s rizikom za pojavu HCC-a, istražili smo i utjecaj polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* na rizik za rani recidiv. Rani recidiv javlja se u 8-20% slučajeva u prve dvije godine nakon transplantacije, a njihova pojava ovisi o nizu čimbenika vezanih uz pacijenta, tumor (stadij, vaskularna invazija, diferencijacija, vrijednosti AFP-a), liječenje i karakteristike donora (157, 158).

Prethodno je evaluiran utjecaj polimorfizama gena *PNPLA3* i *EGF* uz *IL28B* na nepovoljne posttransplantacijske ishode (cirozu grafta, smrt povezanu s jetrenom funkcijom, retransplantaciju no ne i na rani recidiv) pri čemu primateljevi polimorfizmi nisu pokazali nikakav utjecaj dok je donorski G alel *EGF* rs4444903 gena bio povezan s rizikom za razvoj ciroze grafta (159). Naši rezultati nisu pokazali značajnu povezanost primateljevih polimorfizama *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3* gena s rizikom za rani recidiv HCC-a.

Zaključno, ovo je bilo prvo sustavno istraživanje za procjenu genetskog rizika pojave HCC-a u pacijenata s alkoholnom cirozom jetre provedeno na hrvatskoj populaciji te ujedno i prvo ovakvo istraživanje na južno-europskoj populaciji. Pokazali smo neovisnu povezanost polimorfizama gena *PNPLA3* i *EGF* s rizikom pojave HCC-a, dok isto nismo dokazali za *NOTCH3* polimorfizam. Niti jedan od ispitivanih polimorfizama međutim nije bio povezan s pojavom ranog recidiva HCC-a. Kako bi se dodatno rasvijetlila povezanost pojave HCC-a s istraženim genima u budućim istraživanjima potrebno je odrediti i genotip donora kao i proteinsku ekspresiju istraženih čimbenika.

7. ZAKLJUČCI

1. Postojanje G alela polimorfizma *PNPLA3* rs738409 gena povezano je s većim omjerom izgleda za pojavu HCC-a, a statistički značajna povezanost postoji u kodominantnom, recesivnom i log-aditivnom modelu.
2. Postojanje G alela polimorfizma *EGF* rs4444903 gena povezano je s većim omjerom izgleda za pojavu HCC-a, a statistički značajna povezanost postoji u kodominantnom, dominantnom i log-aditivnom modelu.
3. Polimorfizam *NOTCH3* rs1043996 gena nije statistički značajno povezan s rizikom pojave HCC-a u alkoholnoj cirozi.
4. Polimorfizmi *PNPLA3* i *EGF* gena su neovisni prediktori većeg rizika pojave HCC-a u alkoholnoj cirozi.
5. Osim povezanosti GG genotipa *PNPLA3* rs738409 gena s višim serumskim vrijednostima ALT-a, istraživani polimorfizmi nisu povezani s predtransplantacijskim nalazima funkcije jetre i bubrega.
6. Niti jedan od istraživanih polimorfizama nije povezan s kliničkim ili patohistološkim nalazima HCC-a kao niti s rizikom ranog recidiva HCC-a.

8. SAŽETAK

U ovom radu po prvi je puta istražen utjecaj polimorfizama gena *PNPLA3* rs738409, *EGF* rs4444903 i *NOTCH3* rs1043996 na rizik pojave hepatocelularnoga karcinoma (HCC) u hrvatskoj populaciji pacijenata transplantiranih zbog alkoholne ciroze. Uključeno je 260 bolesnika s alkoholnom cirozom od kojih 132 bez i 128 s histološki dokazanim HCC-om. Svim ispitanicima iz uzorka periferne krvi izolirana je DNK te učinjena analiza polimorfizama gena *PNPLA3*, *EGF* i *NOTCH3*. Rezultati pokazuju da su genotip GG za polimorfizam *PNPLA3* te genotip AG i GG za polimorfizam *EGF* povezani s većim omjerom izgleda za pojavu HCC-a, a prisutnost G alela čimbenik je koji doprinosi povećanom riziku. Logističkom regresijom polimorfizmi *PNPLA3* i *EGF* identificirani su kao nezavisni čimbenici rizika za pojavu HCC-a. Polimorfizam *NOTCH3* gena nije statistički značajno povezan s rizikom za HCC. Kada smo analizirali povezanost polimorfizama s kliničkim pokazateljima, samo je genotip GG u usporedbi s genotipom GC/CC *PNPLA3* gena bio povezan s višim vrijednostima ALT-a. Nijedan istraživani polimorfizam nije bio povezan s kliničkim i histološkim karakteristikama tumora niti s rizikom za rani recidiv HCC-a nakon transplantacije jetre.

9. SUMMARY

Association between the single nucleotide polymorphisms for *PNPLA3*, *NOTCH3* and *EGF* with the risk of hepatocellular carcinoma occurrence in patients with alcoholic liver cirrhosis

Ana Bainrauch, 2024.

This paper, for the first time, investigated the contribution of single nucleotide polymorphisms for *PNPLA3* rs738409, *EGF* rs4444903 and *NOTCH3* rs1043996 on the risk of hepatocellular carcinoma (HCC) in the Croatian population of patients transplanted due to alcoholic cirrhosis. The study included 260 patients with alcoholic cirrhosis, 132 without and 128 with histologically proven HCC. DNA was isolated from the peripheral blood sample of all subjects and analysis of *PNPLA3*, *EGF* and *NOTCH3* polymorphisms was performed. The results show that the GG genotype for the *PNPLA3* polymorphism and the AG/GG genotypes for the *EGF* polymorphism are associated with a higher odds ratio for the occurrence of HCC, while the presence of the G allele is a factor contributing to the risk. *PNPLA3* and *EGF* polymorphisms were identified as independent risk factors for the occurrence of HCC. *NOTCH3* polymorphism was not significantly associated with HCC risk. When we analyzed the association of polymorphisms with clinical parameters, only the GG genotype compared to the GC/CC genotype of the *PNPLA3* gene was associated with higher ALT values. None of the investigated polymorphisms was associated with tumor clinical and histological characteristics or with the risk of early recurrence of HCC after liver transplantation.

10. POPIS LITERATURE

1. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018 Jul;69(1):182-236.
2. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM i sur. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;68:723-50.
3. Sidali S, Trépo E, Sutter O, Nault JC. New concepts in the treatment of hepatocellular carcinoma. *United European Gastroenterol J.* 2022;10(7):765-74.
4. Toh MR, Wong EYT, Wong SH, Ng AWT, Loo LH, Chow PK i sur. Global Epidemiology and Genetics of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2023;164(5):766-82.
5. Foglia B, Turato C, Cannito S. Hepatocellular Carcinoma: Latest Research in Pathogenesis, Detection and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):12224.
6. Ganne-Carrié N, Nahon P. Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease. *J Hepatol.* 2019;70(2):284-93.
7. Sagnelli E, Macera M, Russo A, Coppola N, Sagnelli C. Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma. *Infection.* 2020;48(1):7-17.
8. Huang DQ, Tan DJH, Ng CH, Amangurbanova M, Sutter N, Lin Tay PW i sur. Hepatocellular Carcinoma Incidence in Alcohol-Associated Cirrhosis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2023;21(5):1169-77.
9. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol.* 2023;79(2):516-37.
10. HZJZ, Registar za rak RH. Incidencija raka u Hrvatskoj [Internet] 2020. Bilten br.45[*str.* 1-34] Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/11/Bilten-Incidencija-raka-u-Hrvatskoj-2020.-godine.pdf> [Pristupljeno 20.rujna 2023.]
11. Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* 2018;113(2):175-94.
12. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(12):2650-66.

13. Kong LZ, Chandimali N, Han YH, Lee DH, Kim JS, Kim SU i sur. Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2712.
14. Dunn W, Shah VH. Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2016;20(3):445-56.
15. Orman ES, Odena G, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(1):77-84.
16. Lin CJ, Hu ZG, Yuan GD, Lei B, He SQ. Complements are involved in alcoholic fatty liver disease, hepatitis and fibrosis. *World J Hepatol.* 2018;10(10):662-69.
17. Zhou Y, Yuan G, Zhong F, He S. Roles of the complement system in alcohol-induced liver disease. *Clin Mol Hepatol.* 2020;26(4):677-85.
18. Mackowiak B, Fu Y, Maccioni L, Gao B. Alcohol-associated liver disease. *J Clin Invest.* 2024;134(3):e176345.
19. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol.* 2018;69(1):154-81.
20. Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, Gao B, Gual A, Lackner C i sur. Alcoholic liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):16.
21. Subramaniyan V, Chakravarthi S, Jegasothy R, Seng WY, Fuloria NK, Fuloria S i sur. Alcohol-associated liver disease: A review on its pathophysiology, diagnosis and drug therapy. *Toxicol Rep.* 2021;8:376-85.
22. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127:S87-96.
23. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 2004;39(3):155-65.
24. Testino G, Borro P, Ancarani O, Sumberaz A. Human carcinogenesis and alcohol in hepato-gastroenterology. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(4):512-8.
25. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):599-612.
26. Stickel F. Alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Adv Exp Med Biol.* 2015;815:113-30.

27. Runggay H, Murphy N, Ferrari P, Soerjomataram I. Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients*. 2021;13(9):3173.
28. Jacob R, Prince DS, Kench C, Liu K. Alcohol and its associated liver carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2023;38(8):1211-7.
29. Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Lu SC. Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol Res*. 2013;35(1):25-35.
30. Huang DQ, Mathurin P, Cortez-Pinto H, Loomba R. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023;20(1):37-49.
31. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5):35-50.
32. Costentin CE, Minoves M, Kotzki S, Farges O, Gouffé N, Decaens T i sur. Alcohol-related hepatocellular carcinoma is a heterogenous condition: Lessons from a latent class analysis. *Liver Int*. 2022;42(7):1638-47.
33. Costentin CE, Mourad A, Lahmek P, Causse X, Pariente A, Hagège H i sur. CHANGH Study Group. Hepatocellular carcinoma is diagnosed at a later stage in alcoholic patients: Results of a prospective, nationwide study. *Cancer*. 2018;124(9):1964-72.
34. Bucci L, Garuti F, Camelli V, Lenzi B, Farinati F, Giannini EG i sur. Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) Group; Italian Liver Cancer ITA LI CA Group. Comparison between alcohol- and hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: clinical presentation, treatment and outcome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(3):385-99.
35. Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2005;42(2):218-24.
36. N'Kontchou G, Paries J, Htar MT, Ganne-Carrie N, Costentin L, Grando-Lemaire V i sur. Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic or viral C cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(8):1062-8.
37. Meroni M, Longo M, Rametta R, Dongiovanni P. Genetic and Epigenetic Modifiers of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3857
38. Schütte K, Bornschein J, Kahl S, Seidensticker R, Arend J, Ricke J i sur. Delayed Diagnosis of HCC with Chronic Alcoholic Liver Disease. *Liver Cancer*. 2012;1(3-4):257-66.
39. Walker M, El-Serag HB, Sada Y, Mittal S, Ying J, Duan Z i sur. Cirrhosis is under-recognised in patients subsequently diagnosed with hepatocellular cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(5):621-30.

40. Matsushita H, Takaki A. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *BMJ Open Gastroenterol.* 2019;6(1):e000260.
41. Thörn R, Hemmingsson O, Danielsson Borssén Å, Werner M, Karling P, Wixner J. Improved Survival in At-Risk Patients Undergoing Surveillance for Hepatocellular Carcinoma - A Nationwide Swedish Register-Based Study. *J Hepatocell Carcinoma.* 2023;10:1573-86.
42. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020;9(4):875.
43. Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol.* 2018;29(1):14-21.
44. Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245(2):96-108.
45. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.
46. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-18.
47. Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med.* 2019;65:37-55.
48. Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J.* 2008;411(1):1-18.
49. Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci.* 2003;8:69-77.
50. Berumen J, Baglieri J, Kisseleva T, Mekeel K. Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *WIREs Mech Dis.* 2021;13(1):1499.
51. Affo S, Yu LX, Schwabe RF. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:153-86.
52. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31(4):339-46.
53. Llovet JM, Pinyol R, Kelley RK, El-Khoueiry A, Reeves HL, Wang XW i sur. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer.* 2022;3(4):386-401.
54. Nault JC, Zucman-Rossi J. TERT promoter mutations in primary liver tumors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016;40(1):9-14.
55. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):6.
56. Tümen D, Heumann P, Gülow K, Demirci CN, Cosma LS, Müller M i sur. Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines.* 2022;10(12):3202.

57. Kunst C, Haderer M, Heckel S, Schlosser S, Müller M. The p53 family in hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res* 2016;5(6):632-8.
58. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):165.
59. Robert F, Pelletier J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Front Genet*. 2018;9:507.
60. Zhang C, Ye Z, Zhang Z, Zheng J, Tang Y, Hou E i sur. A comprehensive evaluation of single nucleotide polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma risk in Asian populations: A systematic review and network meta-analysis. *Gene*. 2020;735:144365.
61. Goh MJ, Sinn DH, Kim JM, Lee MW, Hyun DH, Yu JI, i sur. Clinical practice guideline and real-life practice in hepatocellular carcinoma: A Korean perspective. *Clin Mol Hepatol*. 2023;29(2):197-205.
62. Ayuso C, Rimola J, Vilana R, Burrel M, Darnell A, García-Criado Á i sur. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines. *Eur J Radiol*. 2018;101:72-81.
63. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á i sur. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*. 2022;76(3):681-93.
64. Wang W, Wei C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Genes Dis*. 2020;7(3):308-19.
65. Luo P, Wu S, Yu Y, Ming X, Li S, Zuo X i sur. Current Status and Perspective Biomarkers in AFP Negative HCC: Towards Screening for and Diagnosing Hepatocellular Carcinoma at an Earlier Stage. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(2):599-603.
66. Joplin LL, Singal AK, Bataller R, Wong RJ, Sauer BG, Terrault NA i sur. ACG Clinical Guideline: Alcohol-Associated Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2024;119(1):30-54.
67. Mancebo A, González-Diéguez ML, Cadahía V, Varela M, Pérez R, Navascués CA i sur. Annual incidence of hepatocellular carcinoma among patients with alcoholic cirrhosis and identification of risk groups. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(1):95-101.
68. Verhulst B, Neale MC, Kendler KS. The heritability of alcohol use disorders: a meta-analysis of twin and adoption studies. *Psychol Med*. 2015;45(5):1061-72.
69. Nahon P, Zucman-Rossi J. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol*. 2012;57(3):663-74.
70. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017;8(66):110635-49.

71. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA i sur. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461-5.
72. Salameh H, Raff E, Erwin A, Seth D, Nischalke HD, Falletti E i sur. PNPLA3 Gene Polymorphism Is Associated With Predisposition to and Severity of Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(6):846-56.
73. Trépo E, Gustot T, Degré D, Lemmers A, Verset L, Demetter P i sur. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2011;55(4):906-12.
74. Friedrich F, Hampe J, Trépo E, Datz C, Romeo S. PNPLA3 genetic variation in alcoholic steatosis and liver disease progression. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015;4(3):152-60.
75. Israelsen M, Juel HB, Detlefsen S, Madsen BS, Rasmussen DN, Larsen TR i sur. GALAXY and MicroBLiver consortiaks. Metabolic and Genetic Risk Factors Are the Strongest Predictors of Severity of Alcohol-Related Liver Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2022;20(8):1784-94.
76. Whitfield JB, Schwantes-An TH, Darlay R, Aithal GP, Atkinson SR, Bataller R i sur. GenomALC Consortium. A genetic risk score and diabetes predict development of alcohol-related cirrhosis in drinkers. *J Hepatol.* 2022;76(2):275-82.
77. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD i sur. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet.* 2015;47(12):1443-8.
78. Schwantes-An TH, Darlay R, Mathurin P, Masson S, Liangpunsakul S, Mueller S i sur. GenomALC Consortium. Genome-wide Association Study and Meta-analysis on Alcohol-Associated Liver Cirrhosis Identifies Genetic Risk Factors. *Hepatology.* 2021;73(5):1920-31.
79. Dong D, Zou Y, Zhang P, Wu Z. Systematic analyses and comprehensive field synopsis of genetic association studies in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(29):45757-63.
80. Stickel F, S, Nischalke HD, Weiss KH, Gotthardt D, Fischer J i sur. Genetic variants in PNPLA3 and TM6SF2 predispose to the development of hepatocellular carcinoma in individuals with alcohol-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2018;113(10):1475-83.
81. Yang J, Trépo E, Nahon P, Cao Q, Moreno C, Letouzé E i sur. A 17-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 13 Variant Protects From Hepatocellular Carcinoma Development in Alcoholic Liver Disease. *Hepatology.* 2019;70(1):231-40.
82. Trépo E, Caruso S, Yang J, Imbeaud S, Couchy G, Bayard Q i sur. Common genetic variation in alcohol-related hepatocellular carcinoma: a case-control genome-wide association

study. *Lancet Oncol.* 2022;23(1):161-71.

83. Buch S, Innes H, Lutz PL, Nischalke HD, Marquardt JU, Fischer J i sur. Genetic variation in TERT modifies the risk of hepatocellular carcinoma in alcohol-related cirrhosis: results from a genome-wide case-control study. *Gut.* 2023;72(2):381-91.

84. Gellert-Kristensen H, Richardson TG, Davey Smith G, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Stender S. Combined Effect of PNPLA3, TM6SF2, and HSD17B13 Variants on Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in the General Population. *Hepatology.* 2020 ;72(3):845-56.

85. Thrift AP, Kanwal F, Liu Y, Khaderi S, Singal AG, Marrero JA i sur. Risk stratification for hepatocellular cancer among patients with cirrhosis using a hepatic fat polygenic risk score. *PLoS One.* 2023;18(2):e0282309.

86. Nahon P, Bamba-Funck J, Layese R, Trépo E, Zucman-Rossi J, Cagnot C i sur. ANRS CO12 CirVir and CIRRAL groups. Integrating genetic variants into clinical models for hepatocellular carcinoma risk stratification in cirrhosis. *J Hepatol.* 2023;78(3):584-95.

87. Anstee QM, Darlay R, Cockell S, Meroni M, Govaere O, Tiniakos D i sur. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort. *J Hepatol.* 2020;73(3):505-15.

88. Salari N, Darvishi N, Mansouri K, Ghasemi H, Hosseini-Far M, Darvishi F i sur. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord.* 2021;21(1):125.

89. Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, Nahon P. PNPLA3 gene in liver diseases. *J Hepatol.* 2016;65(2):399-412.

90. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepat Med.* 2017;9:55-6.

91. Liu Z, Song C, Suo C, Fan H, Zhang T, Jin L i sur. Alcohol consumption and hepatocellular carcinoma: novel insights from a prospective cohort study and nonlinear Mendelian randomization analysis. *BMC Med.* 2022;20(1):413.

92. Kolla BP, Schneekloth TD, Biernacka J, Shah V, Lazaridis KN, Geske J i sur. PNPLA3 Association with Alcoholic Liver Disease in a Cohort of Heavy Drinkers. *Alcohol Alcohol.* 2018;53(4):357-60.

93. Choudhary NS, Duseja A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2021;6:2.

94. Yang J, Trépo E, Nahon P, Cao Q, Moreno C, Letouzé E i sur. PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases. *Int J Cancer*. 2019;144(3):533-44.
95. Mischitelli M, Spagnoli A, Abbatecola A, Codazzo C, Giacomelli M, Parisse S i sur. New Diagnostic and Prognostic Models for the Development of Alcoholic Cirrhosis Based on Genetic Predisposition and Alcohol History. *Biomedicines*. 2023;11(8):2132.
96. Friedrich K, Wannhoff A, Kattner S, Brune M, Hov JR, Weiss KH i sur. PNPLA3 in end-stage liver disease: alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation-free survival. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(7):1477-84.
97. Al Moustafa AE, Achkhar A, Yasmeen A. EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4(2):671-84.
98. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):15-31.
99. Song S, Yu Z, You Y, Liu C, Xie X, Lv H i sur. EGFR/MET promotes hepatocellular carcinoma metastasis by stabilizing tumor cells and resisting to RTKs inhibitors in circulating tumor microemboli. *Cell Death Dis*. 2022;13(4):351.
100. Sueangoen N, Tantiwetrueangdet A, Panvichian R. HCC-derived EGFR mutants are functioning, EGF-dependent, and erlotinib-resistant. *Cell Biosci*. 2020;10:41.
101. Huang P, Xu X, Wang L, Zhu B, Wang X, Xia J. The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *J Cell Mol Med*. 2014;18(2):218-30.
102. Liu Z, Chen D, Ning F, Du J, Wang H. EGF is highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and promotes motility of HCC cells via fibronectin. *J Cell Biochem*. 2018;119(5):4170-83.
103. Zhong JH, You XM, Gong WF, Ma L, Zhang Y, Mo QG i sur. Epidermal growth factor gene polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(3):e32159.
104. Jiang G, Yu K, Shao L, Yu X, Hu C, Qian P i sur. Association between epidermal growth factor gene +61A/G polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis based on 16 studies. *BMC Cancer*. 2015;15:314

105. Baghdadi I, Abu Ella K, El Shaaraway A, Elshayeb E, El-Rebey HS, El Hoseeny M i sur. Genetic Polymorphism of Epidermal Growth Factor Gene as a Predictor of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Cirrhotic Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(7):2047-53.
106. Wang J, Zhong Y, Meng G. EGF rs4444903 polymorphism is associated with risk of HCV-related cirrhosis and HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2021;26(11):2053-64.
107. Zhang S, Qiao K, Trieu C, Huo Z, Dai Q, Du Y i sur. Polymorphism of Epidermal Growth Factor rs4444903 Influences Susceptibility to HCV-Related Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in a Chinese Han Population. *Clin Lab.* 2017;63(4):845-50.
108. Suenaga M, Yamada S, Fujii T, Fuchs BC, Okumura N, Kanda i sur. A functional polymorphism in the epidermal growth factor gene predicts hepatocellular carcinoma risk in Japanese hepatitis C patients. *Onco Targets Ther.* 2013;6:1805-12.
109. King LY, Johnson KB, Zheng H, Wei L, Gudewicz T, Hoshida Y i sur. Host genetics predict clinical deterioration in HCV-related cirrhosis. *PLoS One.* 2014;9(12):e114747.
110. Tanabe KK, Lemoine A, Finkelstein DM, Kawasaki H, Fujii T, Chung RT i sur. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *JAMA.* 2008;299(1):53-60.
111. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):678-89.
112. Kangsamaksin T, Murtomaki A, Kofler NM, Cuervo H, Chaudhri RA, Tattersall IW i sur. NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discov.* 2015;5(2):182-97.
113. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K i sur. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):95.
114. Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10):a011213.
115. Mitchell E, Gilbert M, Loomes KM. Alagille Syndrome. *Clin Liver Dis.* 2018;22(4):625-41.

116. Geisler F, Strazzabosco M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology*. 2015;61(1):382-92.
117. Yue Z, Jiang Z, Ruan B, Duan J, Song P, Liu J i sur. Disruption of myofibroblastic Notch signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression. *Int J Biol Sci*. 2021;17(9):2135-46.
118. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol Res*. 2016;108:57-64.
119. Ni MM, Wang YR, Wu WW, Xia CC, Zhang YH, Xu J i sur. Novel Insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis. *Eur J Pharmacol*. 2018;826:66-74.
120. Zhang Y, Li D, Feng F, An L, Hui F, Dang D i sur. Progressive and Prognosis Value of Notch Receptors and Ligands in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):14809.
121. Huang Q, Li J, Zheng J, Wei A. The Carcinogenic Role of the Notch Signaling Pathway in the Development of Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer*. 2019;10(6):1570-79.
122. Giovannini C, Gramantieri L, Chieco P, Minguzzi M, Lago F, Pianetti S i sur. Selective ablation of Notch3 in HCC enhances doxorubicin's death promoting effect by a p53 dependent mechanism. *J Hepatol*. 2009;50(5):969-79.
123. Wang F, Zhou H, Yang Y, Xia X, Sun Q, Luo J i sur. Hepatitis B virus X protein promotes the growth of hepatocellular carcinoma by modulation of the Notch signaling pathway. *Oncol Rep*. 2012;27(4):1170-6.
124. Zhou L, Zhang N, Song W, You N, Li Q, Sun W i sur. The significance of Notch1 compared with Notch3 in high metastasis and poor overall survival in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e57382.
125. Giovannini C, Baglioni M, Baron Toaldo M, Ventrucci C, D'Adamo S, Cipone M i sur. Notch3 inhibition enhances sorafenib cytotoxic efficacy by promoting GSK3b phosphorylation and p21 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2013;4(10):1618-31.
126. Yu T, Han C, Zhu G, Liao X, Qin W, Yang C i sur. Prognostic value of Notch receptors in postsurgical patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*. 2017;6(7):1587-1600.

127. Niu ZS, Niu XJ, Wang WH. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol.* 2016;22(41):9069-95.
128. Yang W, Zhang T, Song X, Dong G, Xu L, Jiang F. SNP-Target Genes Interaction Perturbing the Cancer Risk in the Post-GWAS. *Cancers (Basel).* 2022;14(22):5636.
129. Liu M, Jiang L, Guan XY. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell.* 2014;5(9):673-91.
130. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol.* 2019;71(3):616-30.
131. Xiang H, Wu Z, Wang J, Wu T. Research progress, challenges and perspectives on PNPLA3 and its variants in Liver Diseases. *J Cancer.* 2021;12(19):5929-37.
132. Raff E, Singal A. PNPLA3 Gene Polymorphism is Associated with Alcohol-Related Liver Injury with Increased Progression to Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: 390. *Am J Gastroenterol.* 2013;108:117.
133. Salameh H, Hanayneh MA, Masadeh M, Naseemuddin M, Matin T, Erwin A i sur. *PNPLA3* as a Genetic Determinant of Risk for and Severity of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Spectrum. *J Clin Transl Hepatol.* 2016;4(3):175-91.
134. Falletti E, Cmet S, Fabris C, Bitetto D, Cussigh A, Fornasiere E i sur. Association between the epidermal growth factor rs4444903 G/G genotype and advanced fibrosis at a young age in chronic hepatitis C. *Cytokine.* 2012;57(1):68-73.
135. Falletti E, Cussigh A, Cmet S, Fabris C, Toniutto P. PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *Dig Liver Dis.* 2016;48(1):69-75.
136. Urias E, Tedesco NR, Burkholder DA, Moran IJ, Miller MJ, Jasty VSJ i sur. Nahon P. PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;58(2):312-8.
137. Guyot E, Sutton A, Rufat P, Laguillier C, Mansouri A, Moreau R i sur. PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;58(2):312-8.
138. Khlaiphuengsin A, Kiatbumrung R, Payungporn S, Pinjaroen N, Tangkijvanich P. Association of PNPLA3 Polymorphism with Hepatocellular Carcinoma Development and

Prognosis in Viral and Non-Viral Chronic Liver Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(18):8377-82.

139. Valenti L, Motta BM, Soardo G, Iavarone M, Donati B, Sangiovanni A i sur. PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(10):e75982.

140. Liu Z, Ning H, He X, Que S, Zhou L. Meta-analysis reveals a specific association of the PNPLA3 I148M polymorphism with ALT level in adolescents. *Per Med.* 2015;12(2):67-82.

141. Yoo T, Lee KW, Yi NJ, Hong SK, Lee JM, Kim H i sur. Impact of PNPLA3 (rs738409-G) polymorphism on post-transplant outcomes after liver transplantation for alcohol-related liver disease. *Clin Transplant.* 2020;34(9):e14011.

142. Trunečka P, Míková I, Dlouhá D, Hubáček JA, Honsová E, Kolesár L i sur. Donor PNPLA3 rs738409 genotype is a risk factor for graft steatosis. A post-transplant biopsy-based study. *Dig Liver Dis.* 2018;50(5):490-5.

143. Crabb DW, Im GY, Szabo G, Mellinger JL, Lucey MR. Diagnosis and Treatment of Alcohol-Associated Liver Diseases: 2019 Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2020;71(1):306-33.

144. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis - 2021 update. *J Hepatol.* 2021;75(3):659-89.

145. Virović Jukić L, Grgurević I, Mikolašević I, Filipec Kanižaj T, Milić S, Mrzljak A i sur. CROATIAN GUIDELINES FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Acta Clin Croat.* 2021;60(2):36-52

146. Shi HZ, Ren P, Lu QJ, Niedrgethmnn M, Wu GY. Association between EGF, TGF- β 1 and TNF- α gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(12):6217-20.

147. Wang Q, Xu L, Wu Q, Zhang M, Zhang J. Association between the risk of hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma and EGF polymorphism: A PRISMA-compliant updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2022;101(42):e31280.

148. Yuan JM, Fan Y, Ognjanovic S, Wang R, Van Den Berg D, Govindarajan S i sur. Genetic polymorphisms of epidermal growth factor in relation to risk of hepatocellular carcinoma: two case-control studies. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:32.

149. Yoshiya S, Fujimoto Y, Bekki Y, Konishi H, Yamashita Y, Ikegami T i sur. Impact of epidermal growth factor single-nucleotide polymorphism on recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer Sci.* 2014;105(6):646-50.
150. Abu Dayyeh BK, Yang M, Fuchs BC, Karl DL, Yamada S, Sninsky JJ i sur. A functional polymorphism in the epidermal growth factor gene is associated with risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2011;141(1):141-9.
151. Garcia-Lezana T, Lopez-Canovas JL, Villanueva A. Signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Adv Cancer Res.* 2021;149:63-101.
152. Qin L, Qiu M, Lin Q, Jiang B, Zhan S, Wei X i sur. Association between novel genetic variants of Notch signaling pathway genes and survival of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* 2024;13(7):e7040.
153. Wang B, Ma X, Zhang W, Li L, Zan Y, Zhan J i sur. Impact of *NOTCH1* polymorphisms on liver cancer in a Chinese Han population. *Cell Cycle.* 2023;22(9):1127-34.
154. Gramantieri L, Giovannini C, Lanzi A, Chieco P, Ravaioli M, Venturi A i sur. Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2007;27(7):997-1007.
155. Hu L, Xue F, Shao M, Deng A, Wei G. Aberrant expression of Notch3 predicts poor survival for hepatocellular carcinomas. *Biosci Trends.* 2013;7(3):152-6.
156. Shi C, Qian J, Ma M, Zhang Y, Han B. Notch 3 protein, not its gene polymorphism, is associated with the chemotherapy response and prognosis of advanced NSCLC patients. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(3):743-52.
157. Straś WA, Wasiak D, Łągiewska B, Tronina O, Hreńczuk M, Gotlib J i sur. Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation: Risk Factors and Predictive Models. *Ann Transplant.* 2022;27:e934924.
158. Filgueira NA. Hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: Risk factors, screening and clinical presentation. *World J Hepatol.* 2019;11(3):261-72.
159. Mueller JL, King LY, Johnson KB, Gao T, Nephew LD, Kothari D i sur. Impact of EGF, IL28B, and PNPLA3 polymorphisms on the outcome of allograft hepatitis C: a multicenter study. *Clin Transplant.* 2016;30(4):452-60.

11. ŽIVOTOPIS

Ana Bainrauch, djevojački Jelić, rođena je 06.05.1988. u Varešu u Bosni i Hercegovini. Nakon završene osnovne škole i opće gimnazije u Varaždinu, 2008. upisuje studij medicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Diplomirala je 2013. godine nakon čega odrađuje pripravnički staž u KBC Zagreb te se 2014. godine zapošljava u Zavod za hitnu medicinu Varaždinske županije. Godine 2015. započinje specijalizaciju iz gastroenterologije u KB Merkur te 2020. polaže specijalistički ispit. Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ upisuje 2018. godine, a svoj znanstveni rad nastavlja u KB Merkur uz suradnju s Laboratorijem za molekularnu imunologiju pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga pod vodstvom prof. dr. sc. Anne Mrzljak i prof. dr. sc. Tomislava Kelave. Tijekom specijalizacije sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta „Temelji liječničkog umijeća“ na diplomskom studiju Medicinskog fakulteta. Aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te je prvi autor na jednom međunarodno indeksiranom radu. Aktivni je član Hrvatskog gastroenterološkog društva (HGD) i Hrvatskog društva za reanimatologiju (CRORC) te instruktor na tečajevima naprednog održavanja života (ALS).