

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Sveučilište u Dubrovniku**

**Institut Ruđer Bošković u Zagrebu**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij**

**Molekularne bioznanosti**

**Ivana Acan**

**ULOGA LIPIDNE PEROKSIDACIJE U MEHANIZMU NASTANKA  
HEPATOCELULARNOG KARCINOMA**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni  
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** Biologija i Temeljne medicinske znanosti

### ULOGA LIPIDNE PEROKSIDACIJE U MEHANIZMU NASTANKA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA

IVANA ACAN

**Disertacija je izrađena u:** Kliničkoj bolnici Merkur, Zajčeva ulica 19, 10000 Zagreb i Institutu Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10 000 Zagreb

**Mentor/i:** doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović, viši znanstveni suradnik

**Kratki sažetak doktorske disertacije:** Oksidacijski stres putem lipidne peroksidacije i reaktivnih aldehida, kao što su 4-hidroksinonenal i akrolein, povezan je s karcinogenezom. Glavni čimbenik rizika za nastanak hepatocelularnog karcinoma (HCC) je dugotrajna izloženost kroničnoj upali. Cilj istraživanja bio je usporediti utječe li uzrok kronične upale jetre (virusna infekcija ili alkohol) na oksidacijski stres. Rad je utvrdio da na nastanak HCC-a ne utječe samo virusna upala, uz prateće tumoru pridružene makrofage i lipidnu peroksidaciju, nego i vanjski čimbenici rizika (npr. alkohol, pušenje, pretilost, dob i spol) koji bi mogli utjecati na akrolein. Oksidacijsko oštećenje tkiva jetre je zbog upale značajno povišeno kod virusnih oboljenja u odnosu na alkoholnu etiologiju. Saznanja o utjecaju lipidne peroksidacije uzrokovane endogenim i egzogenim čimbenicima, pomogli bi pri dijagnostici i liječenju ove maligne bolesti uzrokovane kroničnom upalom ili virusnom infekcijom.

**Broj stranica:** 85

**Broj slika:** 23

**Broj tablica:** 7

**Broj literaturnih navoda:** 155

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Ključne riječi:** oksidacijski stres, hepatitis, hepatocelularni karcinom, 4-hidroksinonenal, akrolein, CD68 makrofagi

**Datum obrane:** 14. svibnja 2021.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. Morana Jaganjac, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, predsjednica;
2. prof.dr.sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
3. dr.sc. Eva Lovrić, znanstvena suradnica, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, član;
4. dr.sc. Lidija Milković, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb (zamjena)

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science  
**Scientific Fields:** Biology and Basic Clinical Sciences

### LIPID PEROXIDATION ROLE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA MECHANISM OF DEVELOPMENT

IVANA ACAN

**Thesis performed at:** University Hospital Merkur, Zajčeva ulica 19, 10 000 Zagreb and Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10 000 Zagreb

**Supervisor/s:** Assistant Professor Ana Čipak Gašparović, PhD, senior research associate

**Short abstract:** Oxidative stress and its consequence, lipid peroxidation and reactive aldehydes, 4-hydroxynonenal and acrolein, contribute to carcinogenesis. Development factor for hepatocellular carcinoma (HCC) is chronic inflammation. The aim of this study was to compare chronic inflammation caused by viral infection or alcohol with oxidative stress. Our research found that the HCC formation is not only influenced by viral inflammation accompanied by tumor associated macrophages and lipid peroxidation but is also related to external risk factors (e.g. alcohol, smoking, obesity, age and sex) which may be associated with acrolein. Oxidative damage to liver tissue due to inflammation is significantly increased in viral infection compared to alcoholic etiology. Knowing the impact of lipid peroxidation caused by endogenous and exogenous factors would help in the diagnosis and treatment of this malignant disease caused by chronic inflammation or viral infection.

**Number of pages:** 85

**Number of figures:** 23

**Number of tables:** 7

**Number of references:** 155

**Original in:** Croatian

**Keywords:** oxidative stress, hepatitis, hepatocellular carcinoma, 4-hydroxynonenal, acrolein, CD68, macrophages

**Date of the thesis defense:** May 14<sup>th</sup>, 2021

#### Reviewers:

1. Morana Jaganjac, PhD, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, commission president;
2. Vera Cesar, PhD, Full Professor in tenure, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayera University of Osijek, member;
3. Eva Lovrić, PhD, research associate, Clinical Hospital Merkur, Zagreb, member;
4. Lidija Milković, PhD, research associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija je izrađena u Klinici za kirurgiju KB Merkur, Odjelu za anesteziju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KB Merkur, Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur u Zagrebu i Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Disertacija je rađena pod mentorstvom doc.dr.sc. Ane Čipak Gašparović.

## ZAHVALA:

*Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Čipak Gašparović na stručnoj i prijateljskoj podršci u planiranju, izradi i pisanju rada te konstruktivnim prijedlozima u pravim trenucima.*

*Veliko hvala doc.dr.sc. Aniti Škrtić s Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur na poticaju za ovaj rad, sugestijama, stručnoj potpori, izradi i obradi patohistoloških preparata. Zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i prenesenom bogatom znanju i iskustvu u patologiji ciroze jetre.*

*Zahvaljujem djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur na nesebičnoj tehničkoj podršci u prikupljanju i obradi patohistoloških uzoraka.*

*Veliko hvala transplantacijskom timu KB Merkur i njegovom voditelju prim. Branislavu Kocmanu na višegodišnjem trudu, radu i podršci u transplantacijskom programu čiji nas entuzijazam svakodnevno inspirira. Iznimno se zahvaljujem Dubravki Lončar-Čakalo, dr. med. i Milici Žmire, dr.med. te mojem mentoru Hrvoju Matasiću, dr.med. koji me uveo u svijet anestezije.*

*Hvala voditelju Laboratorija za oksidacijski stres prof. dr.sc. Nevenu Žarkoviću na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju u izradi ovoga rada. Također, zahvaljujem se svim članovima Laboratorija za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na pomoći tijekom izrade imunohistokemijskih preparata.*

*Zahvaljujem se članovima povjerenstva za ocjenu i obranu ovog doktorskog rada.*

*Hvala svim prijateljima i obitelji koji su mi pružali moralnu podršku. Bez njih ništa ne bi imalo smisla.*

*Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima koji su me naučili kako biti ustrajna, sestri koja me naučila kako biti strpljiva i ljubavi mojega života bez čije bezrezervne pomoći, podrške i ljubavi ne bih postigla sve ovo što jesam.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. OKSIDACIJSKI STRES .....	1
1.1.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....	3
1.2. MEDIJATORI OKSIDACIJSKOG STRESA.....	4
1.3. KARCINOGENEZA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA .....	7
1.4. EPIDEMIOLOGIJA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA.....	10
1.5. ČIMBENICI RIZIKA NASTANKA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA ...	16
1.5.1. VIRUSNE INFEKCIJE.....	16
1.5.2. METABOLIČKE BOLESTI.....	17
1.5.3. UTJECAJ PUŠENJA .....	21
1.5.4. RAZLIKA PREMA SPOLU .....	21
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	24
2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	24
2.2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	26
3.1. ISPITANICI.....	26
3.2. METODE.....	27
3.2.1. PRIPREMA PATOHISTOLOŠKIH PREPARATA.....	29
3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE I ANALIZA .....	29
3.2.3. STATISTIČKA ANALIZA .....	31
4. REZULTATI.....	33
4.1. ISPITANICI.....	33
4.2. ANALIZA PRISUTNOSTI HNE-a.....	36
4.3. ANALIZA PRISUTNOSTI AKROLEINA.....	42
4.4. ANALIZA PRISUTNOSTI CD68 .....	48
5. RASPRAVA .....	54
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. LITERATURA .....	67
8. SAŽETAK .....	83
9. SUMMARY .....	84
10. ŽIVOTOPIS.....	85
11. POPIS RADOVA .....	86

# 1. UVOD

## 1.1. OKSIDACIJSKI STRES

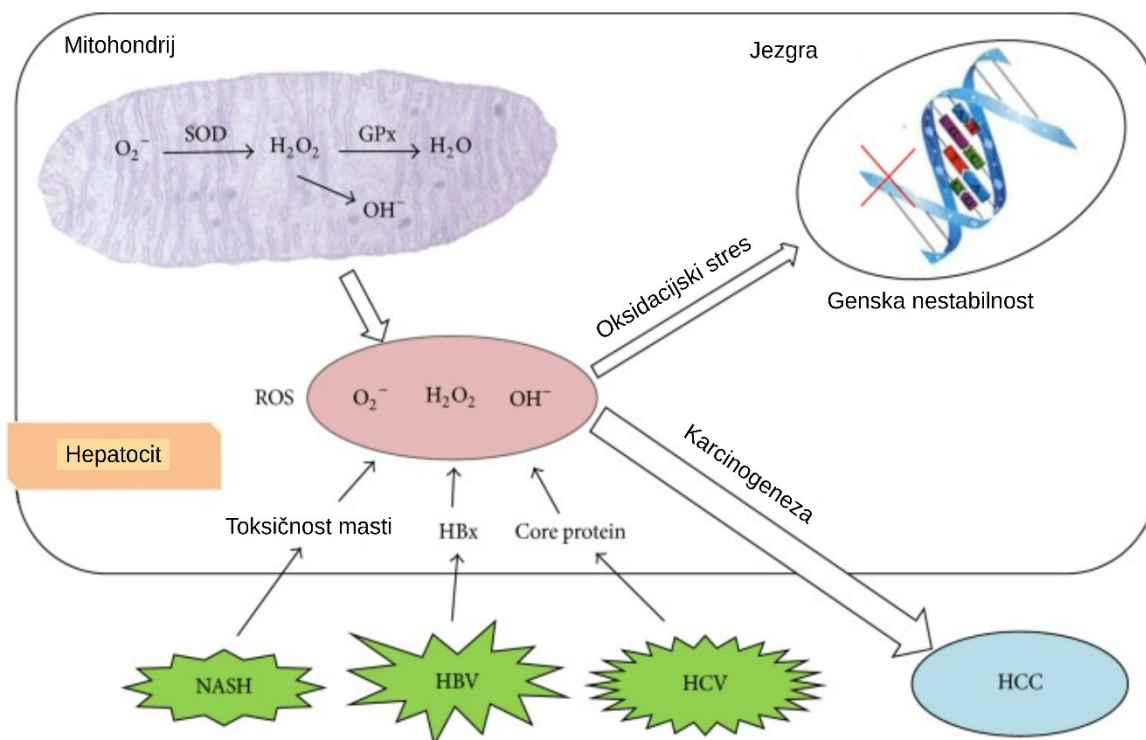
Oksidacijski stres (OS) je poremećaj u ravnoteži između antioksidansa i oksidansa u korist oksidansa, što je još 1985. godine definirao Helmut Sies [1]. Do poremećaja može doći zbog tri glavna razloga: 1. povećanog stvaranja oksidansa, 2. smanjenja antioksidacijske zaštite i 3. neuspješnog popravka nastalih oštećenja. U atmosferi bogatoj kisikom, oksidacijski stres je neizbježna posljedica, a rezultat ove neravnoteže je povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (od engl. *Reactive Oxygen Species* – ROS). U ROS spadaju slobodni radikali kisika kao i vrlo reaktivni spojevi kisika. Slobodni radikal definiran je kao bilo koja čestica s nesparenim elektronom koja može samostalno postojati. Zbog nastojanja da postignu ravnotežno stanje, nespareni elektron slobodnih radikala reagira s elektronom najbliže molekule te se zato smatraju izrazito reaktivnima. Ukoliko je riječ o deoksiribonukleinskoj kiselini (od engl. *Deoxyribonucleic acid* – DNA), ROS će uzrokovati jednolančane i dvolančane lomove te mutacije, kod proteina će izazvati inaktivaciju ili modulaciju aktivnosti, dok će kod lipida uzrokovati oštećenja [2]. Svi ovi događaji vode do poremećaja stanične homeostaze i u konačnici do stanične smrti. Biokemijski su najznačajniji kisikovi i dušikovi radikali, ali i njihove neradikalne inačice. Zajedničkim imenom ove vrste nazivamo ROS te reaktivni dušikovi spojevi (od engl. *Reactive Nitrogen Species* – RNS) [3]. Najčešći oblici ROS-a su, među ostalima, superoksidni anion, vodikov peroksid i hidroksidni radikal. Unutar stanice ROS predominantno nastaje u mitohondrijima, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazama, citokrom P450, endoplazmatskom retikulumu, peroksisomima i lizosomima [4]. Egzogeni ROS se stvara pod utjecajem ultraljubičastih zraka, ionizirajućeg zračenja i ksenobiotika. Antioksidacijski učinak unutar stanice se postiže enzimskim i neenzimskim antioksidansima (npr. glutation – od engl. *Glutathione* – GSH, mokraćna kiselina, melatonin, vitamin C i E, polifenoli, itd.) [5]. Enzimi uključeni u obranu od ROS-a su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza [6].

Osim u mitohondrijima, ROS nastaje i u endoplazmatskom retikulumu djelovanjem citokroma P-450, u području jezgrine ovojnice djelovanjem citokrom oksidaza te u

peroksisomima koji sadrže niz enzima odgovornih za stvaranje vodikovog peroksida [7]. Također, u citoplazmi postoji niz enzima (oksidaze i dehidrogenaze), od kojih je najpoznatiji ksantin oksidaza, čijim djelovanjem nastaje ROS. Najbolje okarakteriziran enzim koji katalizira redukciju kisika do superoksidnog aniona je NADPH oksidaza (od engl. *Nitric oxide system* – NOX) [8]. To je oksidaza koja se nalazi u membrani fagocita, a služi u obrani organizma od infekcija mikroorganizmima. Osim endogenih izvora, ROS može u organizmu nastati i uslijed izlaganja egzogenim izvorima kao što su ionizirajuće zračenje, ultraljubičasto zračenje, ozon, dim cigareta, industrijski onečišćivači i lijekovi. ROS utječu na različite unutarstanične signalne putove uključujući protein tirozin fosfatazni put, put protein kinaze C (PKC), fosfatidilinozitol-3 kinazni (PI3K)/AKT put ili mitogenom aktiviran protein kinazni put (od engl. *Mitogen activated protein kinase* – MAPK) [9]. Također, ROS utječe i na transkripcijske čimbenike: nuklearni čimbenik  $\kappa B$  (od engl. *Nuclear factor  $\kappa B$*  – NF- $\kappa B$ ) i nuklearni čimbenik 2 (od engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* – NRF2) [10]. ROS uzrokuju i aktivaciju metaloproteinaza matriksa, enzima koji razgrađuju kolagen i laminin bazalne membrane BEC-a što također dovodi do povećanja propusnosti BBB-a. Osim direktnog utjecaja, ROS djeluju i kao sekundarni glasnici te uzrokuju aktivaciju dušik oksid sintaze (NOS) te potiču stvaranje peroksinitrita. Produkcija peroksinitrita može biti značajnija od produkcije vodikovog peroksida i superoksidnog aniona jer peroksinitrit u reakciji s ugljikovim dioksidom može stvarati tri iznimno potentna radikala – hidroksilni, dušikov dioksid i karbonatni radikal [11]. Svaki od ova tri radikala imaju sposobnost aktivacije lipidne peroksidacije (od engl. *Lipid peroxidation* – LPO).

U uvjetima ravnoteže slobodni radikali se u stanici razgrađuju enzimatskim i neenzimatskim putevima [12]. U enzimatske antioksidanse superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Neenzimatski antioksidansi su albumin, transferin i metalotioneini, te oni male molekularne mase: mokraćna kiselina, lipoična kiselina, GSH i ubikinol, vitamini C i E te flavonoidi [12]. Stanica se štiti od oksidacijskog stresa na više razina. Na prvoj se sprječava stvaranje slobodnih radikala. To je moguće postići održavanjem niskog tlaka kisika u tkivima, "zatvaranjem" enzima koji stvaraju radikale u peroksisome, lizosome, mitohondrije te vezanjem iona željeza, bakra, hemoglobina i hema u komplekse s proteinima (transferin, feritin, ceruloplazmin, albumin, haptoglobin, hemopeksin) kako bi se držali redoks neaktivnima. Ako sprječavanje stvaranja radikala ne uspije na ovoj razini, na slijedećoj već stvorene slobodne radikale hvataju i neutraliziraju antioksidansi. Treća se razina odnosi na popravak štete, ako zaštita na prve dvije razine ne uspije [13].





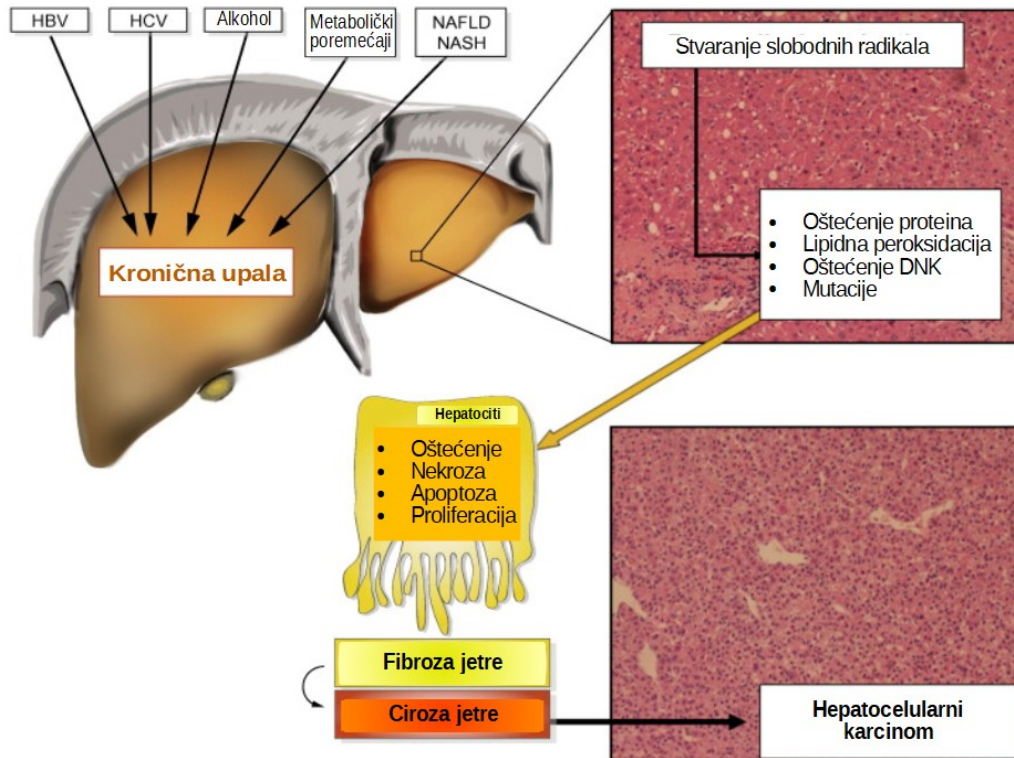
Slika 1. Oksidacijskim stresom uzrokovani nastanak HCC-a na staničnoj razini. Prilagođeno prema [14].

### 1.1.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Oksidacija lipida može biti neenzimska ili enzimaska. Neenzimska, potaknuta djelovanjem ROS-a, pri čemu dolazi do degradacije lipida i, posljedično, do stvaranja visoko reaktivnih spojeva poput 4-hidroksinonenala (HNE), malondialdehida (MDA) i akroleina [15] dok je enzimaska potaknuta djelovanjem peroksidaza kao što su ciklooksigenaza (od engl. *Cyclooxygenase*– COX), lipoksigenaza (od engl. *Lipoxygenase* – LOX), fosfolipaza A2 (od engl. *Phospholipase A2* – PLA2) i citokroma P450 (od engl. *Cytochrome P450*– CYP450) [16], [17].

HNE se smatrao sekundarnim toksičnim glasnikom jer oštećuje stanice i dovodi do njihove smrti, međutim danas se o njemu govori kao o glasniku slobodnih radikala, jer je sve više priznata njegova uloga u prijenosu signala i modulaciji rasta stanica čime se izuzima riječ „toksičan“ [2]. Tijekom oksidacijskog stresa, nastali HNE se smatra važnim čimbenikom

inicijacije i promocije karcinogeneze. U brojnim tumorima, pa tako i u hepatocelularnom karcinomu (HCC) (Slika 1), opisana je nazočnost HNE i drugih reaktivnih aldehida nastalih peroksidacijom lipida [18].



Slika 2. Etiološki čimbenici i središnja uloga oksidacijskog stresa u patogenetskom razvoju bolesti jetre. Oksidacijski stres je glavni patogeni događaj koji se javlja kod nekoliko poremećaja jetre. Kronična ozljeda jetre uslijed HBV i HCV infekcije, prekomjerna konzumacija alkohola i metabolički poremećaji određuju prooksidativno stanje koje uzrokuje oštećenje proteina i DNA te peroksidaciju lipida. Obnavljanje hepatocita rezultira fibrozom i cirozom jetre, što može dovesti do nastanka hepatocelularnog karcinoma. Prilagođeno prema [19].

## 1.2. MEDIJATORI OKSIDACIJSKOG STRESA

Lipidnom peroksidacijom nastaju medijatori oksidacijskog stresa koji utječu na stanične signalne puteve [20]. LPO je lančana reakcija oksidacijske razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (od engl. *Polyunsaturated fatty acids* – PUFA) koja preko posrednika oksisterola, hidroperoksida i endoperoksida dovodi do stvaranja reaktivnih  $\alpha$ ,  $\beta$  aldehida

(HNE, akrolein), dialdehida (malonildialdehid – MDA, glioksal) i ketoaldehida (4-oksotransnonenal i izoketali) [15].

PUFA-e i njihovi metaboliti imaju brojne fiziološke uloge: izvor energije, izgradnja stanične membrane, dio su staničnih signalnih puteva i posljedično regulacije ekspresije gena. PUFA su podložne oksidaciji slobodnim radikalima čime se pokreću lančane reakcije koje dalje oštećuju biomolekule. Kako je već rečeno, reaktivni aldehidi, kao što su MDA, propanal, heksenal i HNE, nastaju kao krajnji proizvodi LPO [21]. . Reaktivni aldehidi su, za razliku od ROS-a, relativno stabilniji te mogu difundirati od mjesta nastanka i širiti oksidacijsko oštećenje na molekule daleko od početnog oštećenja uzrokovanog ROS-om [2].

Zbog prisutnosti konačnih produkata LPO u brojnim bolestima kao što su šećerna bolest (ŠB), ateroskleroza, tumori i neurodegenerativne bolesti, smatra se da bi LPO mogla biti jedan od njihovih uzroka nastanka i razvoja [22]. Od tri najviše istražena aldehida (HNE, akrolein i MDA), akrolein je 100 puta reaktivniji od HNE-a, dok je HNE je za sada najbolje opisan i istražen aldehyd [22–25]. HNE se još naziva i glasnikom slobodnih radikala, budući da je stabilniji od slobodnih radikala i kao takav može difundirati unutar stanice i izaći iz stanice te reagirati na udaljenim područjima [26]. Također je i izrazito reaktivan aldehyd koji se veže za DNA, lipide i proteine u stanici. HNE u visokim koncentracijama uzrokuje smrt stanice inhibirajući ključne metaboličke enzime. S druge strane, u niskim koncentracijama HNE stimulira ekspresiju gena koji imaju ulogu u adaptivnom odgovoru na stres [28]. Uloga HNE-a u organizmu varira od fiziološke do patološke zbog uključenosti HNE-a u brojne signalne putove kojima se reguliraju diferencijacija, proliferacija, upala i apoptoza [25]. HNE nastaje enzimskim djelovanjem lipoksigenaze (od engl. *Lipoxygenase* – LOX) i neenzimskim putem kao rezultat LPO ω6 PUFA, kao što su arahidonska kiselina i linolna kiselina, njegovo stvaranje je potaknuto u prisutnosti NADPH ovisnih enzima i dodatno ubrzano u prisutnosti iona željeza [15]. Spoj reaktivnih aldehida s proteinima membrane je aktivan u fiziološkim i patofiziološkim reakcijama, može utjecati na različite funkcionalne promjene stanice. Vjerojatno je da su pojedini učinci HNE-a i njemu sličnih aldehida na stanični odgovor posredovani njihovom interakcijom sa proteinima stvaranjem kovalentnih veza ili promjenama njihove ekspresije i/ili aktivnosti [27].

*In vitro* istraživanja pokazala su da HNE u visokim koncentracijama (>50 μM) uzrokuje trenutno povećanje propusnosti krvno-mozgovne barijere [29]. Iako je HNE u visokim koncentracijama citotoksičan, u niskim koncentracijama HNE iskazuje pozitivne učinke na

stanični ciklus i proliferaciju endotelnih stanica [30, 31], a uzrokovanjem netoksične oksidacije proteina, HNE može potaknuti dugoročnu zaštitu stanica kroz aktivaciju NRF2 signalnog puta te tako štiti stanicu od budućih oksidacijskih oštećenja [32]. Kao što je već rečeno, u visokim koncentracijama, HNE uzrokuje pojačanu oksidaciju proteina, posebice onih s visokim udjelom tiolnih skupina kao što su proteini mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma [33]. Ovakve modifikacije proteina uzrokuju aktivaciju proupalnih čimbenika i dovode do poremećaja funkcije endotelne barijere, ali i potenciraju daljnja oksidacijska oštećenja koja dovode do poremećaja funkcije mitohondrija i sinteze proteina [34,35].

Akrolein je proizvod LPO i staničnog metabolizma pojedinih aminokiselina. Djeluje citotoksično na mnoge stanice, uključujući i hepatocyte ovisno o izloženoj koncentraciji na način da smanjuje antioksidativnu zaštitu stanice i povećava stres unutar endoplazmatskog retikuluma te remeti funkcije mitohondrija [44]. Proizvodi OS, među kojima je i akrolein, mogu mijenjati kovalentne veze proteina s bioaktivnim aldehydima. Ti reaktivni aldehydi se smatraju sekundarnim glasnicima slobodnih radikala jer reagiraju s velikim biomolekulama, posebice s proteinima mijenjajući njihovu građu i funkcije. Iz tog razloga se reaktivni aldehydi koriste i kao značajni biološki biljezi brojnih patofizioloških procesa [45].

Kako bi spriječile štetne učinke reaktivnih aldehyda te drugih oksidansa, stanice su razvile različite mehanizme obrane. Glavni i najučinkovitiji sustav obrane od oksidansa, a posebice HNE-a je putem glutationa (od engl. *Glutathione* – GSH) [36]. GSH je tripeptid koji ima sposobnost vezanja oksidansa svojim cisteinskim ostatkom, a ova reakcija je dodatno katalizirana djelovanjem glutation-S-transferaze [37, 38]. Čak 60% HNE-a u vaskularnim stanicama metabolizira se ovim putem [39]. HNE i drugi oksidansi mogu se vezati i direktno na GSH i tako nastali konjugati, a specifično GSH-HNE iz stanice se izbacuju RLIP76 (od engl. *Ral interacting protein of 76 kD*) sustavom i sustavom proteina višestruke otpornosti na lijekove (od engl. *Multidrug resistance protein 1*– MRP1) [40, 41]. Jedan od bitnih metaboličkih putova detoksikacije HNE-a je i oksidacija ili redukcija do njegove odgovarajuće kiseline ili alkohola aldoketo reduktazama. Tako aldehyd dehidrogenaza oksidira HNE do 4-hidroksinonenoične kiseline (HNA), dok aldehyd reduktaza reducira HNE do 1,4-dihidroksinonena (DHN) [42]. Oksidacijski put aldehyd dehidrogenazama aktivira se u stanju blagog stresa, dok se redukcijski put aldehyd reduktazom aktivira u stanjima akutnog stresa. HNE inhibira metabolizam acetaldehyda, koji se metabolizira kao i alkohol, putem alkohol dehidrogenaze. Pojačana LPO prisutna kod ovisnosti od alkohola povećava razine

HNE-a čime se ugrožava stanična eliminacija acetaldehida i potiče alkoholna jetrena fibroza [43].

Nealkoholni steatohepatitis (od engl. *Non alcoholic steatohepatitis* – NASH) najčešći je oblik kronične bolesti jetre u svijetu, vezana uz oksidacijski stres, disfunkciju mitohondrija i hepatocelularnu apoptozu [46]□ .

Kupfferove stanice imaju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru jetre radi čega rastu i istraživanja o nastanku nealkoholne masne bolesti jetre (od engl. *Non-alcoholic fatty liver disease* – NAFLD). Većinom su lokalizirane u lumenu jetrenih sinusoida, čine 80-90% makrofaga u ljudskom tijelu. To su fagocitne stanice koje imaju sposobnost samoobnavljanja, rijetko migriraju iz jetre, imaju ključnu ulogu u reguliranju i održavanju funkcija jetre. Aktivira ih oštećenje jetre, pri čemu oslobađaju upalne citokine i kemokine [47].

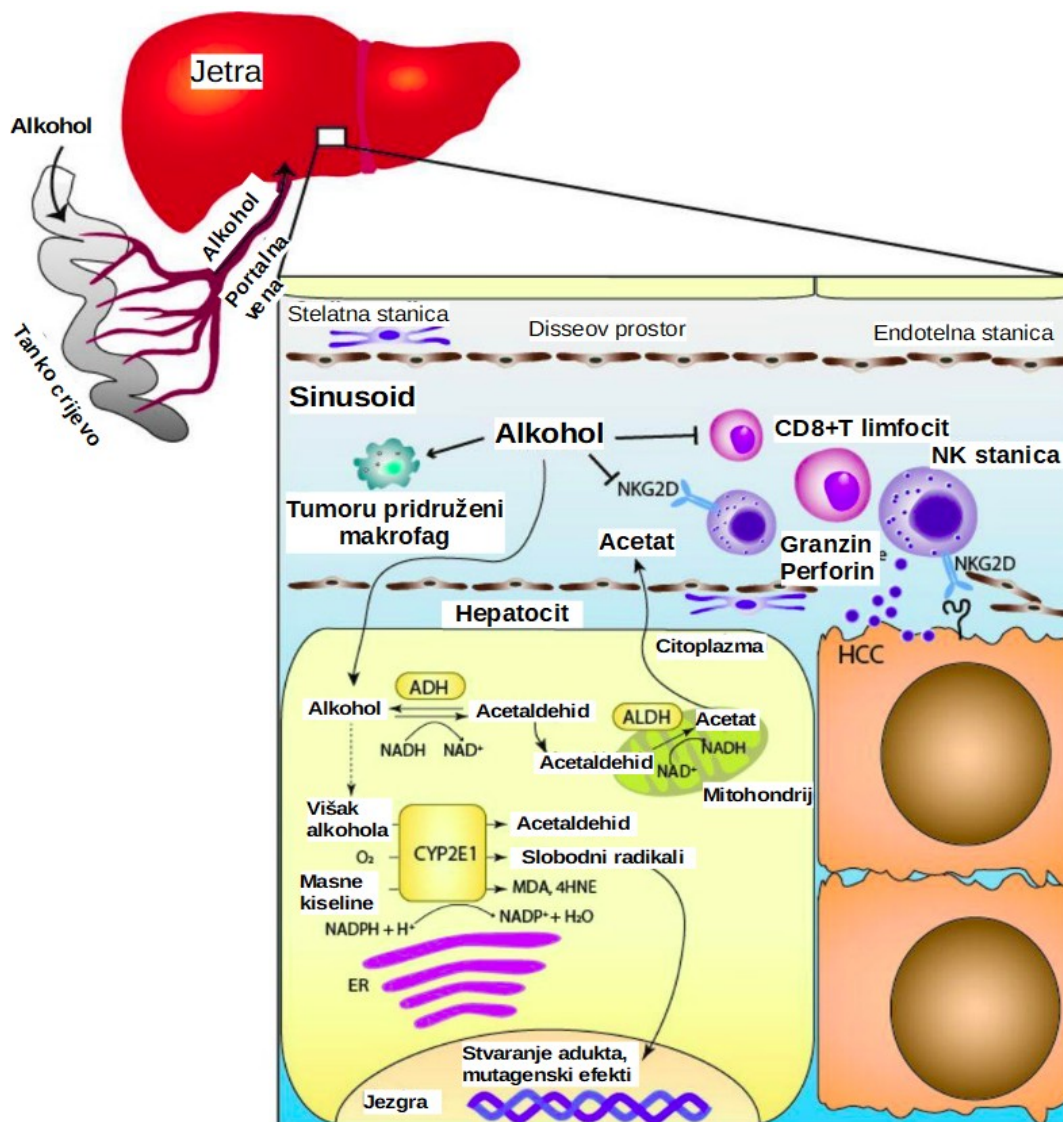
U fiziološkim uvjetima Kupfferove stanice imaju klasičnu ulogu imunoloških stanica i štite jetru od bakterijskih infekcija. U patološkim uvjetima aktiviraju ih različite komponente te se diferenciraju u M1 (klasične) ili M2 (alternativne) makrofage. Metabolizam klasičnih ili alternativno aktiviranih Kupfferovih stanica odredit će njihove funkcije u oštećenju jetre [48]□ . Lipidi i njihovi metaboliti te lipopolisaharidi mogu aktivirati Kupfferove stanice. Jednom aktivirane, Kupfferove stanice pojačavaju ekspresiju upalnih citokina, čime se pojačava stupanj nekroze oko jetrenih stanica te se mijenja ekspresija gena povezanih uz nastanak fibroze i oksidativnog oštećenja, uzrokujući nastanak NASH. Kupfferove stanice u NASH-u imaju 4 uloge, izazivaju upalu, steatozu, oksidacijski stres i fibrozu [47]□ .

### **1.3. KARCINOGENEZA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA**

Brojni su čimbenici odgovorni za karcinogenezu u jetri, uključujući hepatitis B virus (HBV) i hepatitis C virus (HCV) infekciju, ovisnost o alkoholu i NASH [49]□ . Oksidacijski stres kao posljedica patoloških procesa inducira oksidacijsko oštećenje DNA, posljedično izaziva mutacije te mijenja ekspresiju proteina dovodeći organizam u stanje izrazite ranjivosti. Jetreno oštećenje može biti akutni ili kronični upalni proces. U uvjetima lokalne upale aktiviraju se brojne stanice, kao što su sinusoidne endotelne stanice, stelatne stanice, dendritične stanice i Kupfferove stanice. Ove stanice stvaraju brojne medijatore upale,

citokine i kemokine. Dodatno, oksidacijskim oštećenjem DNA može biti narušen i popravak DNA što dovodi do nakupljanja genskih mutacija i oštećenja stanica i tkiva. Poznato je da kronična upala uzrokuje oksidacijski/nitrozativni stres i posljedično LPO, povećavajući time dodatno razinu stresa zajedno s aldehydima, koji lako reagiraju s DNA čime nastaju dodatne mutacije, te povećavaju razinu promutagenog djelovanja ROS-a.

Oksidacijski stres može nastati kao posljedica ROS-a nastalog u nealkoholnoj steatotičnoj jetri, koja oštećuje hepatocite, potiče patološku polipoidizaciju, stimulira nastanak upale i potiče nastanak inzulinske rezistencije (IR) [50]. Dodatno, oksidacijski stres sudjeluje i pri invaziji i metastaziranju HCC. Provedena su klinička istraživanja o uporabi bioloških biljega oksidacijskog stresa o ranoj detekciji HCC-a i njegova recidiva, iako ne multicentrično, randomizirano [51, 52]. Nekontrolirana proliferacija s jedne strane i poremećena apoptoza s druge uzrokuju promjene upalnih procesa čime se potiče maligna transformacija. Zna se da je promijenjeni redoks status stanica karcinoma povezan s LPO i nastankom reaktivnih lipidnih elektrofila, posebice HNE-a.



Slika 3. Shema imunološkog sustava u nadzoru HCC-a i metabolički učinci izloženosti alkoholu na hepatocite. Metabolizam etanola putem ovisnim o CYP2E1 stvara acetaldehid radikale i proizvode peroksidacije lipida, poput MDA i HNE. Konzumacija alkohola smanjuje broj CD8 + T stanica i NK stanica, a smanjuje ekspresiju NKG2D na NK stanicama. HNE, 4-hidroksinonenal; ADH, alkohol dehidrogenaza; ALDH, aldehyd dehidrogenaza; CYP2E1, citokrom P450 2E1; ER, endoplazmatski retikulum; HCC, hepatocelularni karcinom; MDA, malondialdehyd; NK, prirodni ubojica; NKG2D, NK skupina 2D. Prilagođeno prema [53].

Uz oksidacijski stres, acetaldehyd koji nastaje pri izlaganju alkoholu, dimu cigarete, onečišćenju zraka i šećeru, iznimno je reaktivan kancerogen i stvara brojne DNA lezije koje dalje mogu utjecati na otpornost stanice te inhibirati in vitro replikaciju i transkripciju [54]. Acetaldehyd i LPS potiču Kupfferove stanice na oslobađanje ROS-a, proupalnih citokina i kemokina koji doprinose infiltraciji neutrofila [55]. HCC ne nastaje kod svih ovisnika o alkoholu. Ostaje nejasno je li tome doprinosi i genetski utjecaj ili razvijeni zaštitini

mehanizmi. Intermedijarni proizvodi nastali od ROS-a iz citokroma P4502E1 te iz oksidacijskog sustava mikrosoma, gdje se metabolizira alkohol, su jedna od mogućnosti kojima se jetrena DNA oštećuje čime oni prelaze iz prokarcinogena u karcinogene više od bilo koje druge kemikalije iz alkoholnog pića [56]. Procesi nastanka HCC-a vezani uz oksidacijski stres i metabolizam alkohola prikazani su na slici 3.

Studija iz Kine iz 2003. godine koji je proveo Huang sa suradnicima upućuje na značajan doprinos u ranoj detekciji HCC-a, odnosno uporabu transverzije G u T kodon 249 tumor supresor gena p53 kao ranog dijagnostičkog biljega HCC-a kod osoba izloženih aflatoksinu i HBV infekciji [57].

#### **1.4. EPIDEMIOLOGIJA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA**

Karcinom jetre je šesti po učestalosti postavljenih dijagnoza malignih bolesti u svijetu, međutim, loša prognoza čini ga četvrtim uzrokom smrti od karcinoma odmah iza karcinoma pluća, debelog crijeva i želuca. U većini zemalja, HCC čini 75-85% od ukupnih primarnih karcinoma jetre [58]. Rano otkrivanje HCC-a pomnim nadzorom i praćenjem rizičnih skupina bolesnika te liječenjem jetrenih oboljenja je značajno poboljšano petogodišnje preživljenje [59]. HCC najčešće nastaje u podlozi ciroze jetre, HBV infekcije, HCV infekcije ili nealkoholnog steatohepatitisa. Jetrena bolest u podlozi ograničava učinkovitost liječenja [60].

Stupanj incidencije zloćudnih novotvorina jetre varira ovisno o geografskom položaju, najviši stupanj incidencije je u Istočnoj Aziji i južnom saharском dijelu Afrike. Otkrivanje HCC-a u ranom stadiju bolesti značajno je poboljšalo petogodišnje preživljenje bolesnika. Iz tog razloga, sustav zdravstva potiče sistemski probir i nadzor visokorizične ciljane populacije u svrhu rane detekcije HCC-a [61]□ .

Epidemiologija HCC-a [58]:

- 6. najčešća zloćudna novotvorina u svijetu (854 000 slučajeva širom svijeta u 2015. godini uz 810 000 smrtnih slučajeva kao posljedica HCC-a), 4. najčešći uzrok smrti



kod zloćudnih oboljenja; uzrokuje 20-40% smrtnih slučajeva u Kini, Japanu, južno saharскоj Africi

- Visoki stupanj oboljenja u Koreji, Taiwanu, Aziji i Mozambiku te u zemljama gdje je prisutan endemijski hepatitis; također je visoki stupanj oboljenja i u Francuskoj i Italiji, rijetko u Sjevernoj Americi
- Postoci variraju ovisno o čimbenicima rizika: kronični hepatitis B (HBV) 33%, alkohol 30% ili hepatitis C (HCV) 21%; novorođenčad HBV nositelja imaju 200% rizik; izloženost aflatoksinu (zemlje u razvoju), pušenje, ciroza (85% zapadnih zemalja svijeta s HCC-om ima prisutnu cirozu)
- Ostali najčešći čimbenici rizika su izloženost Thorotrastu, androgeni steroidi, tirozinemija
- Viši postotak oboljenja kod crne rase u odnosu na bijelu rasu (4:1); omjer prema spolu muškarci:žene je 2.5:1
- Većina bolesnika su stari oko 60+ godina s cirozom ili 20 do 40 godina bez ciroze, ponekad su sekundarni tumori kod Wilmsovog tumora

Tablica 1. Novi slučajevi raka u Republici Hrvatskoj (RH) 2018. godine najčešća sijela prema spolu – broj, postotak, stope incidencije, kumulativne stope [19]

<b>MUŠKARCI – Primarno sijelo</b>	<b>BROJ NOVIH SLUČAJEVA</b>	<b>POSTOTAK %</b>	<b>STOPA INCIDENCIJE</b>	<b>STANDARDIZIRANE STOPE (SVJETSKO STANOVNIŠTVO)*</b>	<b>KUMULATIVNE STOPE (0 - 74 godine)</b>
<b>SVA SIJELA – ALL SITES</b>	<b>13952</b>	<b>100</b>	<b>706,4</b>	<b>352,8</b>	<b>42,8</b>
PROSTATA	2867	21	145,2	65,2	8,8
TRACHEA, BRONCHUS ET PULMO (PRIM.)	2244	16	113,6	54,3	7,2
INTESTINUM CRASSUM EXCL. RECTUM	1240	9	62,8	28,9	3,5
RECTUM, RECTOSIGMA ET ANUS	881	6	44,6	21,5	2,6
VESICA URINARIA	752	5	38,1	17,3	2,1
REN ET ORGANA URIN. ALTERA	644	5	32,6	16,9	2,0
VENTRICULUS	535	4	27,1	12,2	1,4
MELANOMA	501	4	25,4	14,2	1,7
PANCREAS	407	3	20,6	9,5	1,1
HEPAR	357	3	18,1	9,0	1,2
OSTALO – <i>Other</i>	3524	25			

<b>ŽENE – Primarno sijelo</b>	<b>BROJ NOVIH SLUČAJEVA</b>	<b>POSTOTAK %</b>	<b>STOPA INCIDENCIJE</b>	<b>STANDARDIZIRANE STOPE (SVJETSKO STANOVNIŠTVO)*</b>	<b>KUMULATIVNE STOPE (0 - 74 godine)</b>
<b>SVA SIJELA – ALL SITES</b>	<b>11671</b>	<b>100</b>	<b>552,4</b>	<b>263,9</b>	<b>29,7</b>
MAMMA FEMININA	2845	24	134,7	69,7	8,0
TRACHEA, BRONCHUS ET PULMO (PRIM.)	998	9	47,2	20,2	2,7
INTESTINUM CRASSUM EXCL. RECTUM	929	8	44,0	16,0	1,8
CORPUS UTERI	778	7	36,8	17,5	2,2
GLANDULA THYREOIDEA	580	5	27,5	21,1	2,0
RECTUM, RECTOSIGMA ET ANUS	579	5	27,4	11,2	1,3
OVARIUM, TUBA FALLOPII ET ADNEXA	462	4	21,9	11,1	1,2
MELANOMA	425	4	20,1	10,7	1,2
PANCREAS	398	3	18,8	6,7	0,8
VENTRICULUS	335	3	15,9	5,5	0,6
OSTALO – <i>Other</i>	3342	29			
OSTALO – <i>Other</i>	3342	29			

- STOPE NA 100.000 (CRUDE AND STANDARDISED INCIDENCE ARE RATES PER 100.000 PERSONS)

- SAMO INVAZIVNI RAK (ONLY INVASIVE CANCERS ARE INCLUDED IN THE ABOVE TABULATIONS) – \* DIREKTNIA METODA (DIRECT METHOD)

Tablica 2. Broj novih slučajeva raka prema spolu, dobi te primarnom sijelu u RH 2018. [19]

FRA MKB X REVIZIJA PRIMARNO SIJELO	SPOL	UKUPNO	DOB - AGE																			Nep. Unkn.
			SEX	ALL AGES	0- 4	5- 9	10- 14	15- 19	20- 24	25- 29	30- 34	35- 39	40- 44	45- 49	50- 54	55- 59	60- 64	65- 69	70- 74	75- 79	80- 84	
C00 LABIUM ORIS	M	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	5	8	4	10	7	3	0
	Ž	33	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	1	8	10	8	0	0
	UK	74	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	6	11	5	18	17	11	0
C01 BASIS LINGVAE	M	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	12	6	6	0	3	2	0	0
	Ž	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	4	3	1	2	1	0	0	0
	UK	50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	6	16	9	7	2	4	2	0	0
C02 PARTES ALTERAE ET PARTES NON SPEC. LINGVAE	M	84	0	0	0	0	0	1	1	1	3	6	11	20	16	13	5	3	4	0	0	0
	Ž	34	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	3	5	5	6	1	1	1	6	0	0
	UK	118	0	0	0	0	1	1	1	1	3	9	14	25	21	19	6	4	7	6	0	0
C03 GINGIVA	M	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	1	4	2	2	2	2	0	0
	Ž	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	3	2	5	2	0	0
	UK	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	6	2	5	5	4	7	2	0	0
C04 BASIS ORIS	M	26	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	13	3	1	0	1	0	0	0
	Ž	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	1	0	0	1	0
	UK	32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	14	5	2	0	1	0	1	0
C05 PALATUM	M	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5	6	2	2	1	0	0	0
	Ž	14	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3	0	2	2	2	1	1	0	2	0
	UK	35	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	7	5	8	4	3	2	0	0	2	0
C06 PARTES ALTERAE ET PARTES NON SPEC. ORIS	M	27	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	8	3	4	2	3	4	1	1	0	0
	Ž	12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	3	1	1	1	1	2	0
	UK	39	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	8	4	6	5	4	5	2	2	2	0
C07 GLANDULA PAROTIS	M	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	2	4	4	1	1	4	0
	Ž	25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	1	2	5	2	3	3	3	5	0
	UK	45	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	3	2	3	7	6	7	4	4	9	0
C08 GLANDULAE SALIVALES ALTERAE ET NON SPEC.	M	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	1	0	1	0	1	0	0
	Ž	8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	2	1	0
	UK	15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	2	1	2	0	2	0	2	1	0
C09 TONSILLA	M	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	10	7	12	2	2	2	1	0
	Ž	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	3	1	0	0	0	0	0
	UK	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	13	7	15	3	2	2	1	0	0
C10 OROPHARYNX	M	51	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	8	6	14	7	8	1	4	0	0	0
	Ž	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	0	0	0	0	0
	UK	62	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	8	8	17	10	11	1	4	0	0	0
C11 EPIPHARYNX	M	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	5	2	0	1	1	1	1	1	0
	Ž	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	UK	19	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	5	2	2	1	1	2	1	1	0
C12 SINUS PIRIFORMIS	M	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	1	0	0	0	0	0
	Ž	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	UK	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	3	1	0	0	0	0	0
C13 HIPOPHARYNX	M	86	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	10	21	24	6	6	6	5	0	0	0
	Ž	7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	5	0	0	0	0	0	0
	UK	93	0	0	0	0	0	0	0	2	1	12	11	21	29	6	6	6	5	0	0	0
C14 PHARYNX NON SPEC.	M	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
	Ž	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	UK	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	1	0
C15 OESOPHAGUS	M	161	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7	12	27	33	33	14	21	10	2	0	0
	Ž	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	10	8	4	3	4	0	0	0
	UK	198	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7	13	30	43	41	18	25	13	6	0	0
C16 VENTRICULUS	M	535	0	0	0	0	0	1	1	2	8	7	19	41	82	87	76	98	58	55	0	0
	Ž	335	0	0	0	0	0	1	4	4	2	6	10	25	31	36	41	60	68	47	0	0
	UK	870	0	0	0	0	0	2	5	6	10	13	29	66	113	123	117	158	126	102	0	0
C17 INTESTINUM TENUE INC. DUODENUM	M	36	0	0	0	0	1	0	1	2	2	1	3	4	2	7	4	4	1	4	0	0
	Ž	39	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	3	7	2	5	8	6	4	0	0
	UK	75	0	0	0	0	1	0	1	2	3	4	7	9	9	9	12	7	7	8	0	0
C18 INTESTINUM CRASSUM EXCL. RECTUM	M	1240	0	0	1	0	0	3	2	9	16	25	48	70	194	230	196	205	149	92	0	0
	Ž	929	0	0	0	0	1	5	5	9	21	48	61	95	147	98	155	157	126	0	0	0
	UK	2169	0	0	1	0	1	4	7	14	25	46	96	131	289	377	294	360	218	0	0	0
C19 COLON RECTOSIGMOIDEUM	M	175	0	0	0	0	0	1	1	0	5	8	16	27	43	23	23	20	8	0	0	
	Ž	113	0	0	0	0	0	0	2	3	1	7	10	17	20	11	16	13	13	0	0	
	UK	288	0	0	0	0	0	1	3	3	6	15	26	44	63	34	39	33	21	0	0	
C20 RECTUM	M	681	0	0	0	0	0	2	5	10	21	35	72	120	135	84	97	66	34	0	0	
	Ž	443	0	0	0	0	0	1	2	5	6	14	21	38	59	67	64	78	51	37	0	
	UK	1124	0	0	0	0	0	1	4	10	16	35	56	110	179	202	148	175	117	71	0	
C21 ANUS ET CANALIS ANALIS	M	25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	3	4	3	4	0	2	3	1	0	
	Ž	23	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4	2	3	3	0	3	2	2	0	
	UK	48	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	7	6	7	7	0	5	5	3	0	
<b>C19+C20+C21 (154 ICD IX)</b>	<b>M</b>	<b>881</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>30</b>	<b>46</b>	<b>92</b>	<b>150</b>	<b>182</b>	<b>107</b>	<b>122</b>	<b>89</b>	<b>43</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
	<b>Ž</b>	<b>579</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>50</b>	<b>79</b>	<b>90</b>	<b>75</b>	<b>97</b>	<b>66</b>	<b>52</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
	<b>UK</b>	<b>1460</b>																				

Tablica 3. Broj i postotak novih slučajeva raka prema stadiju bolesti, spolu i primarnom sijelu u RH 2018. [19]

ŠIFRA MKB X REVIZIJA PRIMARNO SIJELO ICD No X REV. PRIMARY SITE	SPOL SEX	BROJ SLUČAJEVA NUMBER OF CASES		STUPANJ BOLESTI - STAGE						NEPOZNATO- UNKNOWN	
		UKUPNO TOTAL	IZ ONKO FROM ONKO	LOKALIZIRAN LOCALIZED		REGIONALNO PROŠIREN REGIONAL		UDALJENE METASTAZE DISTANT		UKUPNO TOTAL	
				BROJ NUMBER	%	BROJ NUMBER	%	BROJ NUMBER	%	BROJ NUMBER	%
C00 LABIUM ORIS	M	41	39	13		1				25	64,1
	Ž	33	32	10		1				21	65,6
	UK	74	71	23	32,4	2				46	64,8
C01 BASIS LINGVAE	M	34	33	4		12		1		16	48,5
	Ž	16	16	1		2				13	
	UK	50	49	5		14		1		29	59,2
C02 PARTES ALTERAE ET PARTES NON SPEC. LINGVAE	M	84	83	9		23	27,7	4		47	56,6
	Ž	34	33	6		8		1		18	54,5
	UK	118	116	15	12,9	31	26,7	5		65	56,0
C03 GINGIVA	M	19	19	1		5		1		12	
	Ž	17	16	1		6		1		8	
	UK	36	35	2		11		2		20	57,1
C04 BASIS ORIS	M	26	24	6		9				9	
	Ž	6	5	1						4	
	UK	32	29	7		9				13	
C05 PALATUM	M	21	21	4		8				9	
	Ž	14	14	3		3		1		7	
	UK	35	35	7		11		1		16	45,7
C06 PARTES ALTERAE ET PARTES NON SPEC. ORIS	M	27	26	4		7		2		13	
	Ž	12	10	1		4				5	
	UK	39	36	5		11		2		18	50,0
C07 GLANDULA PAROTIS	M	20	18	4		5				9	
	Ž	25	24	3		8		1		12	
	UK	45	42	7		13		1		21	50,0
C08 GLANDULAE SALIVALES ALTERAE ET NON SPEC.	M	7	7			2				5	
	Ž	8	8	1		2				5	
	UK	15	15	1		4				10	
C09 TONSILLA	M	39	39	2		20	51,3	1		16	41,0
	Ž	8	8	2		3				3	
	UK	47	47	4		23	48,9	1		19	40,4
C10 OROPHARYNX	M	51	51	3		16	31,4	4		28	54,9
	Ž	11	11			8				3	
	UK	62	62	3		24	38,7	4		31	50,0
C11 EPIPHARYNX	M	14	14			4		1		9	
	Ž	5	4							4	
	UK	19	18			4		1		13	
C12 SINUS PIRIFORMIS	M	12	12			8				4	
	Ž										
	UK	13	13			8				5	
C13 HIPOPHARYNX	M	86	85	5		42	49,4	5		33	38,8
	Ž	7	7			5				2	
	UK	93	92	5		47	51,1	5		35	38,0
C14 PHARYNX NON SPEC.	M	3	2	1						1	
	Ž	3	2							2	
	UK	6	4	1						3	
C15 OESOPHAGUS	M	161	159	12		30	18,9	23	14,5	94	59,1
	Ž	37	34	6		5		2		21	61,8
	UK	198	193	18	9,3	35	18,1	25	13,0	115	59,6
C16 VENTRICULUS	M	535	520	51	9,8	123	23,7	94	18,1	252	48,5
	Ž	335	308	32	10,4	63	20,5	57	18,5	156	50,6
	UK	870	828	83	10,0	186	22,5	151	18,2	408	49,3
C17 INTESTINUM TENUE INC. DUODENUM	M	36	36	5		13		3		15	41,7
	Ž	39	39	2		12		3		22	56,4
	UK	75	75	7		25	33,3	6		37	49,3
C18 INTESTINUM CRASSUM EXCL. RECTUM	M	1240	1201	164	13,7	410	34,1	172	14,3	455	37,9
	Ž	929	893	106	11,9	318	35,6	114	12,8	355	39,8
	UK	2169	2094	270	12,9	728	34,8	286	13,7	810	38,7
C19 COLON RECTOSIGMOIDEUM	M	175	171	27	15,8	62	36,3	22	12,9	60	35,1
	Ž	113	112	7		43	38,4	17	15,2	45	40,2
	UK	288	283	34	12,0	105	37,1	39	13,8	105	37,1
C20 RECTUM	M	681	666	100	15,0	180	27,0	100	15,0	286	42,9
	Ž	443	426	41	9,6	116	27,2	69	16,2	200	46,9
	UK	1124	1092	141	12,9	296	27,1	169	15,5	486	44,5
C21 ANUS ET CANALIS ANALIS	M	25	24	2		4		2		16	66,7
	Ž	23	23	3		3		2		15	65,2
	UK	48	47	5		7		4		31	66,0
C22 HEPAR (PRIM. ET NON SPEC.) ET VIAE BILIARES INTERNAE	M	357	325	19	5,8	31	9,5	44	13,5	231	71,1
	Ž	153	130	9		9		22	16,9	90	69,2
	UK	510	455	28	6,2	40	8,8	66	14,5	321	70,5
C23 VESICA FELLEA	M	50	48	3		5		10		30	62,5
	Ž	74	71	10		14		11		36	50,7
	UK	124	119	13		19	16,0	21	17,6	66	55,5
C24 PARTES ALTERAE ET NON SPEC. TRACTUS BILIARIS	M	71	68	13		5		7		43	63,2
	Ž	73	72	6		10		9		47	65,3
	UK	144	140	19	13,6	15	10,7	16	11,4	90	64,3
C25 PANCREAS	M	407	384	18	4,7	45	11,7	120	31,3	201	52,3
	Ž	398	379	16	4,2	42	11,1	96	25,3	225	59,4
	UK	805	763	34	4,5	87	11,4	216	28,3	426	55,8
C26 TRACTUS DIGESTIVUS NON SPEC.	M	26	23	3		1		6		13	
	Ž	43	34			1		15	44,1	18	52,9
	UK	69	57	3		2		21	36,8	31	54,4

HCC ima visoki stupanj mortaliteta, većinom iz razloga što je bolest dijagnosticirana u kasnom stadiju s omjerom incidencije/mortaliteta koji je približno 1. Na primjer, 2015. godine u svijetu je otkriveno približno 850 000 novih slučajeva karcinoma jetre, u usporedbi s 810 000 umrlih radi karcinoma jetre na godinu. HCC čini oko 75-85% primarnih karcinoma jetre čime predstavlja veliki globalni zdravstveni problem. Primjenom cjepiva protiv HBV-a i globalnim liječenjem HCV-a, epidemiologija HCC-a se mijenja, povećava se broj slučajeva NASH-a u odnosu na broj oboljelih od hepatitisa. Ultrazvučno praćenje, s ili bez kontrole vrijednosti  $\alpha$ -fetoproteina, svakih 6 mjeseci, značajno poboljšava rano otkrivanje i ukupno preživljenje; međutim, ograničenja u provođenju i dalje dovode do kasnog otkrivanja HCC-a u velikom broju slučajeva [58]□ . Naime, čimbenici rizika povezani s razvojem HCC-a su različiti te uključuju genetski utjecaj, imunološki utjecaj, virusna infekcija, utjecaj okoliša i parametri domaćina. Parametri domaćina su muški spol, starost iznad 50 godina, obiteljska predispozicija, pretilost, uznapredovala ciroza jetre ili ciroza s koinfekcijom nekim drugim hepatotropnim virusom i HIV virusom. Utjecaj okoliša čine ovisnost o alkoholu, pušenje i izloženost aflatoksinu.

Klinički gledano, treba imati na umu da su oboljeli, često kritično bolesni, starije osobe, sa značajnim pridruženim sistemskim bolestima (srce, pluća) praćenim između ostalog poremećajima hemostaze, bubrežne funkcije i elektrolita [62]□ .

HCC je trenutno vodeći uzrok smrti kod cirotičnih bolesnika [63]□ , dok su prije morbiditet i mortalitet kod ciroze bili posljedica drugih komplikacija bolesti, kao što su jetrena encefalopatija, krvarenja iz gornjeg dijela probavnog trakta iz varikoziteta jednjaka, spontani bakterijski peritonitis i hepatorenalni sindrom. Razlog produljenom preživljenju usporedno s porastom incidencije je rana dijagnoza i optimizirano liječenje neonkoloških komplikacija.

Iznimno je važna kontrola virusnog hepatitisa te promjena načina življenja kako bi se na globalnoj razini smanjio pritisak od nastalih karcinoma jetre. Značajan nadzor je potreban kako bi se bolest otkrila što ranije i time se promijenio trend incidencije [64]□ .

Visok stupanj mortaliteta kod HCC-a je dijelom i iz razloga što se HCC otkrije u podmaklom stadiju bolesti te zbog neučinkovitog sistemskog liječenja HCC-a [65]□ . Tijekom liječenja HCC-a postoje dva izazova, prvi je rano otkrivanje bolesti i drugi je liječenje, no prevladavanje oba je izrazito teško, stoga je obično HCC fatalan unatoč ranom postavljanju dijagnoze i otkrivanju bolesti. Trenutno ne postoji jedinstveni način stupnjevanja

bolesti radi jake raznolikosti tumora, ishodišne bolesti jetre i funkcionalne rezerve same jetre [66].

Iako je stupnjevanje bolesti varijabilno, parametri koji definiraju uznapredovali stupanj HCC-a, nepogodnog za liječenje su: tumorska invazija portalne vene i/ili ekstrahepatalne metastaze, uz relativno očuvanu jetrenu funkciju i funkcionalni status. Općenito govoreći, iz primjene sistemskog liječenja izostavljeni su bolesnici s Child Pugh klasa B i C cirozom jetre, najvećim dijelom radi jednakog rizika mortaliteta i ciroze. Sistemsko liječenje bi moglo biti pogodno i za bolesnike s neresektabilnim HCC-om, kod kojih nije pogodna primjena lokoregionalnog liječenja, iako nije ni u potpunosti jasan trenutak kada započeti primjenu sistemskog liječenja.

## **1.5. ČIMBENICI RIZIKA NASTANKA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA**

### **1.5.1. VIRUSNE INFEKCIJE**

Kod većine bolesnika, ciroza jetre prethodi HCC-u. Glavne čimbenike rizika čine kronična infekcija s hepatitis B virusom (HBV) i hepatitis C virusom (HCV), toksini (alkohol i aflatoksin), metabolički (ŠB i NAFLD, nasljedna hemokromatoza) te imunološki posredovano (primarna bilijarna ciroza – PBC i autoimuni hepatitis). Aflatoksin B1 sinergistično djeluje s HBV uzrokujući nastanak HCC-a. Točne mehanizme nastanka HCC-a potrebno je dodatno istražiti kao i interakciju između toksina i HBV-a pri nastanku malignog oboljenja [67]. □ Procjenjuje se da je HBV odgovoran za nastanak 33% HCC-a u svijetu, dok je 21% posljedica HCV infekcije [58]. Postotak procijepljenosti populacije, HCV i alkoholna ciroza jetre glavni su čimbenici rizika za nastanak HCC-a.

Količina i duljina konzumacije alkohola direktno je proporcionalna broju oboljelih od alkoholne ciroze. Alkohol se ne može deponirati u organizmu, već se metabolizira putem oksidacijskih procesa, pretežno u jetri. Alkoholno oštećenje jetre je povezano i s nutritivnim statusom. Oksidacijski stres etanolskog metabolizma može se povećati zbog manjka antioksidacijskih vitamina, masne prehrane te povećanom apsorpcijom željeza iz crijeva i, posljedično, povećanom koncentracijom željeza u jetrenom tkivu. Ovakav oksidacijski stres

uzrokuje LPO čime se inducira oštećenje hepatocita. HBV ili HCV infekcija povećavaju incidenciju jetrene bolesti kod alkoholičara. Alkoholizam kod kroničnog HCV-a dvostruko povećava rizik od nastanka HCC-a. Pojedine prospektivne studije su pokazale da je trenutno HCC vodeći uzrok smrti u svijetu kod cirotičara, dok su u prošlosti morbiditet i mortalitet HCC-a bili definirani ostalim neneoplastičnim komplikacijama bolesti [51]□ .

### **1.5.2. METABOLIČKE BOLESTI**

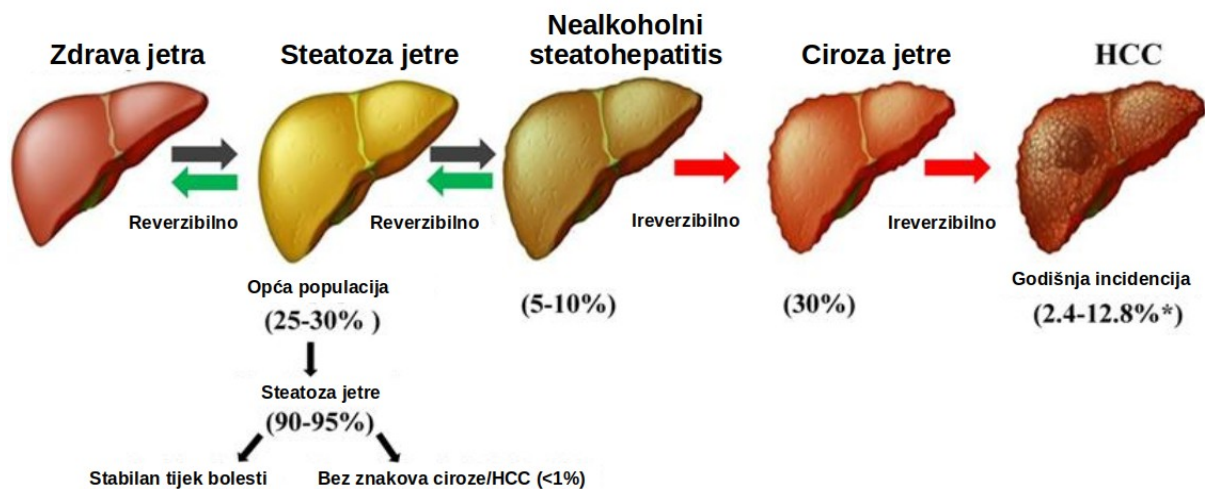
Značajan porast incidencije ŠB i pretilosti također može utjecati na povećanu incidenciju HCC-a, posebice u razvijenim zemljama, gdje se čak bilježi i epidemija pretilosti. ŠB tip 2 je neovisno povezana s povećanim rizikom od nastanka HCC. Rizik je veći kod duljeg trajanja ŠB uz prateće metaboličke poremećaje, što upućuje na nastalu inzulinsku rezistenciju (IR) u patogenezi HCC-a [68]□ . Mehanizmi karcinogeneze kod HCV-a i kod metaboličkog sindroma imaju zajedničko prisutnu IR [69]□ . NASH je jetrena manifestacija metaboličkog sindroma koji je povezan s IR, intolerancijom na glukozu i ŠB tipa 2. Prekomjerna prehrana inducira nastanak kronične upale, još je jedan čimbenik koji bi mogao potaknuti IR pojačanom ekspresijom SOCS3 u jetri i aktiviranjem izoformi protein kinaze C. Neregulirana protein kinaza C i IGF1 povećavaju IRS-1 i njegove ciljne nizove PI3K/Akt i SREBP-1c, koji na kraju potiču nakupljanje lipida i razvoj steatohepatitisa [70].

Pretpostavka je da IR igra važnu ulogu u hepatokarcinogenezi u bolesnika s HBV-om i s ŠB tip 2 ili čak predijabetesom. Pokazalo se da povezanost rizika od ŠB i HCC-a nije neovisna od ciroze, iako je većina slučajeva HCC-a imala cirozu. Nedavni sustavni pregled pokazao je da je istodobna ŠB snažno povezana s povećanim rizikom od HCC među kroničnim bolesnicima s HCV-om, ali dostupni su samo oskudni dokazi o korelaciji između ŠB i HCC-a kod bolesnika s kroničnim HBV-om. Klinički krajolik HCV-a trenutno se suočava s velikom promjenom, tako da bi njegovo liječenje bilo univerzalno za bolesnike koji imaju pristup učinkovitom liječenju, što će definitivno rezultirati smanjenjem razvoja HCC-a. Stoga bi infekcija HBV-om, konzumacija alkohola i metabolički poremećaji, poput ŠB i pretilosti, trebali biti vodeći etiološki čimbenici HCC-a u narednoj budućnosti [71]□ . Kao posljedica nastalog promijenjenog načina života s naglaskom na pojačani unos kalorija i manjak tjelovježbe, nastaje globalni porast pretilosti i metaboličkog sindroma. Iz tog razloga će HCC,

nastao kao posljedica prisutne pretilosti i nealkoholnog steatohepatitisa (NASH-a), u budućnosti postati vodeći svjetski zdravstveni problem [72]□ . NAFLD se kreće od jednostavne steatoze u odsutnosti prekomjernog uzimanja alkohola do NASH s ili bez ciroze. Otprilike 3-15% pretilih bolesnika s NASH-om napreduje u cirozu, a oko 4-27% NASH kod bolesnika s cirozom prelazi u HCC (Slika 4). Također, poznato je da se HCC može novo razviti kod bolesnika s NASH-om bez prisutnosti ciroze. Godišnja kumulativna incidencija HCC-a povezanog s NASH-om je niska (2,6%) u usporedbi s četiri posto virusnog HCC-a [73]□ . NAFLD pogađa 25% svjetske odrasle populacije s rasponom od 135% u Africi i 31.8% na Bliskom Istoku. NAFLD je usko povezana s konstelacijom metaboličkih popratnih bolesti koje uključuju: pretilost, ŠB tip 2, povišeni krvni tlak (od engl. *Arterial hypertension – AH*) i hiperkolesterolemiju (Slika 5) [74]□ . Ciroza, nastala kao posljedica NASHa, postala je jedna od najčešćih indikacija za transplantaciju jetre (od engl. *Liver transplantation – LTX*), osobito kod kandidata starijih od 65 godina. Tipično, kandidati za razvoj NASH-a imaju istodobno prisutan rizik od pretilosti, poremećenog metabolizma i kardiovaskularnog sustava, što izravno utječe na procjenu i odabir pacijenta, morbiditet i mortalitet na listi čekanja i na kraju ishoda nakon transplantacije [75]□ . Zbog povećane učestalosti metaboličkog sindroma (MetS) i njegovih komponenata, NASH ciroza i hepatocelularni karcinom uzrokovani NASH-om uskoro će postati glavna indikacija za LTX [76]□ .

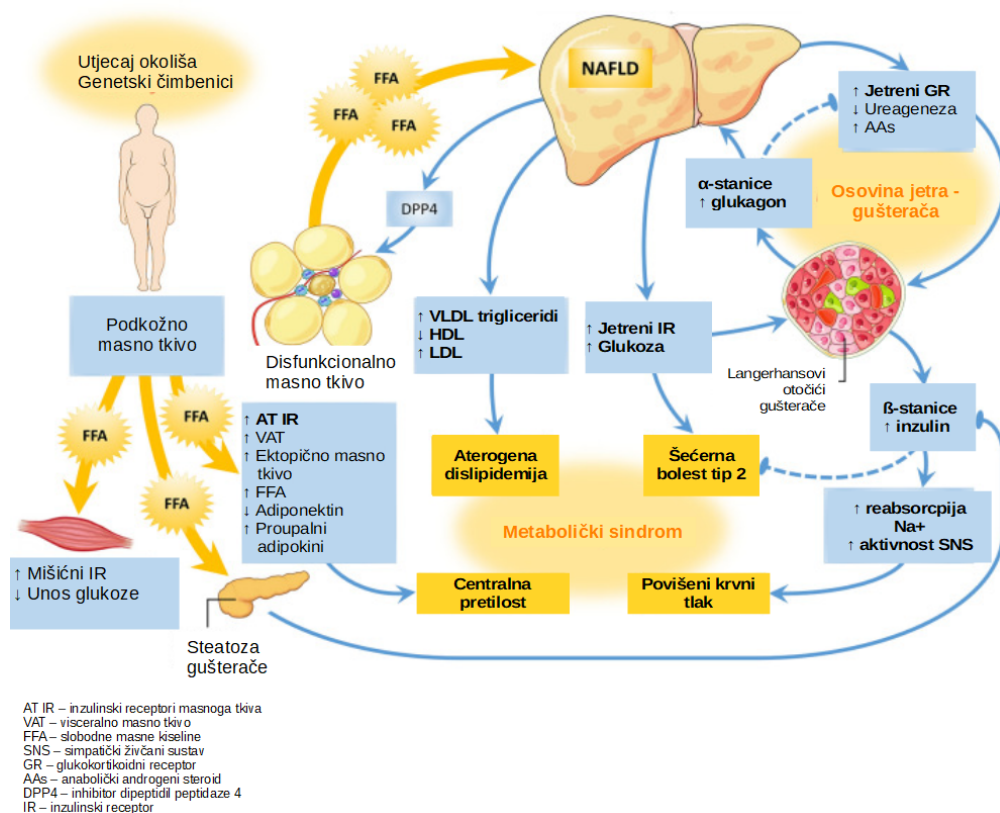
NAFLD-a se ispoljava kao jednostavna nealkoholna masna bolest jetre, steatoza (od engl. *Non-alcoholic fatty liver – NAFL*), nealkoholni steatohepatitis (NASH) i ciroza. NAFLD ima prevalenciju od 70% među bolesnicima sa ŠB tip 2. Prekomjerna tjelesna težina/pretilost i IR čvrsto su povezani s NAFLD-om [77]□ . Postoji uska povezanost između IR i NAFLD-a, gdje je pet puta veća prevalencija NAFLD-a kod bolesnika sa ŠB tip 2 u odnosu na onu kod bolesnika bez ŠB tip 2. Mehanizmi u osnovi ovih procesa uključuju genetske čimbenike, nakupljanje masnoće u jetri, promjene u metabolizmu energije i upalne signale dobivene iz različitih tipova stanica, uključujući imunološke stanice. Kod fibroze povezane s NASH-om, glavni tip stanica odgovornih za proizvodnju izvanstaničnog matriksa su jetrene stielne stanice [78]□ .





Slika 4. Progresija NAFLD-a. NAFLD se ispoljava brojnim stupnjevima oštećenja od jednostavne steatoze/nakupljanja masti do NASH-a, ciroze i HCC-a. Iako je visoka prevalencija NAFLD-a u općoj populaciji, oko 25-30%, kod većine bolesnika se ispoljava sa steatozom jetre, koja nema utjecaj na konačno preživljenje ili jačinu jetrenog oštećenja. Samo 5-10% bolesnika sa NAFLD-om razvija NASH, a 30% ih sa NASH-om kasnije razvija cirozu jetre. Ovisno o stupnju oštećenja (sa ili bez ciroze), raspon incidencije HCC-a je 2.4-12.8%. Prilagođeno prema [47]. NAFLD: steatoza jetre, NASH: nealkoholni steatohepatitis; HCC: hepatocelularni karcinom

Bilježi se opći porast prevalencije NAFLD-a, pri čemu Azija prednjači u porastu, no Sjedinjene Države pomno slijede s porastom prevalencije s 15% u 2005. na 25% tijekom 5 godina [79]. Za predviđanje progresije NAFLD bolesti koristi se Markov model. Incidencija NAFLD-a temelji se na povijesnim i projiciranim promjenama u prevalenciji odraslih pretilosti i ŠB tip 2. Pretpostavke su izvedene iz objavljene literature gdje je dostupna i potvrđena pomoću podataka nacionalnog nadzora za incidenciju HCF-a povezanih s NAFLD. Predviđene promjene u cirozi koja je povezana s NAFLD-om, uznapređovalom bolešću jetre i smrtnošću zbog jetre kvantificirane su do 2030. Ukupna prevalencija NAFLD-a među odraslom populacijom (u dobi od 15 godina) projicira se na 33.5% u 2030. godini, a srednja dob populacije NAFLD-a povećat će se s 50 na 55 godina tijekom razdoblja 2015. do 2030. Učestalost dekompenzirane ciroze povećat će se 168% na 105 430 slučajeva do 2030. godine, dok će se incidencija HCC povećati za 137% na 12 240 slučajeva. Broj smrtnih slučajeva jetre povećat će se 178% na oko 30 000 smrtnih slučajeva u 2030. godini. Tijekom razdoblja 2015. do 2030. predviđa se gotovo 800 000 suvišnih smrtnih slučajeva jetre [80].



Slika 5. Patofiziologija NAFLD kao kontinuum od pretilosti do metaboličkog sindroma i ŠB

Čimbenici okoliša utječe na ekspresiju gena, potičući debljanje. Kada se postigne kapacitet širenja potkožnog masnog tkiva (od engl. *Adipose tissue* – AT), dolazi do povećane mobilizacije slobodnih masnih kiselina (FFA), što rezultira taloženjem visceralne i ektopične masti. Jedno ektopično mjesto je mišić, gdje povećano taloženje FFA pospješuje IR, inhibirajući unos glukoze posredovanog inzulinom. S druge strane, AT rezistencija na inzulin olakšava lipolizu i povećava protok FFA u jetru, inducirajući jetrenu IR i povećavajući proizvodnju glukoze, „de novo“ lipogenezu u jetri, oslobađanje VLDL i aterogenu dislipidemiju. FFA se prelijevaju u gušteraču, uzrokujući disfunkciju β-stanica lipotoksičnošću, hiperglikemijom i ŠB (hipoteza dvostrukog ciklusa). Povećana masnoća u jetri također potiče otpornost na glukagon u jetri (GR) u odnosu na metabolizam aminokiselina (od engl. *Amino acid* – AA), smanjujući ureagenezu i rezultirajući hiperaminoacidemijom. Povećani AA stimuliraju proizvodnju glukagona da nadoknadi jetreni GR, a instaliran je začarani krug (os jetre i gušterače). Ova hiperglukagonemija također dovodi do povećanog otpuštanja glukoze u jetri. Globalno IR stanje rezultira hiperinzulinemijom, što može pojačati reapsorpciju natrija i povećati aktivnost simpatičkog živčanog sustava,

pridonoseći nastanku povišenog krvnog tlaka. Upaljeni disfunkcionalni AT postaje otporniji na inzulin i oslobađaju proupalne adipokine, dok smanjuju protuupalni adiponektin. U jetri trigliceridi i toksični metaboliti uzrokuju lipotoksičnost, mitohondrijsku disfunkciju i stres endoplazmatskog retikuluma, što dovodi do oštećenja hepatocita, apoptoze i fibroze. Ovi nefunkcionalni hepatociti sintetiziraju i luče dipeptidil peptidazu 4 (DPP4), koja potiče upalu AT makrofaga i više IR. Uperene strelice označavaju stimulaciju ili pojačanje, dok tupi krajevi ukazuju na inhibiciju ili potiskivanje. Isprekidane strelice označavaju progresivno smanjivanje puta. Prilagođeno prema [81].

### **1.5.3. UTJECAJ PUŠENJA**

Dodatni rizik za razvoj HCC-a je dim cigarete što podupire sinergiju pušenja, konzumacije alkohola i kroničnog virusnog hepatitisa za nastanak HCC. Dugogodišnji pušači, prema literaturi, s preko 20 konzumiranih cigareta na dan u usporedbi s onima koji puše manje količine cigareta, nisu imali slabije preživljenje, a ni vrijeme apstinencije od pušenja također nije imalo značaja u usporedbi s godinama starosti. Značajna je pak povezanost pušenja i alkohola. Pušenje nije neovisno povezano s preživljenjem od HCC-a [82]□ .

### **1.5.4. RAZLIKA PREMA SPOLU**

Incidencija nastanka HCC-a ovisno o dobi ide u prilog hipoteze o zaštitnoj ulozi estrogena. Varijacije između rasnih/etničkih grupa i dobna podjela među spolovima, posebice kod osoba mlađih od 50 godina, mogu biti povezane s izloženosti različitim utjecajima rizika od nastanka HCC-a između spolova. To može biti unutarnja ili vanjska izloženost spolnim hormonima te pretilost u djetinjstvu/mladosti [83]□ . Muškarci imaju veći rizik od nastanka HCC-a, stoga ne postoje značajne spolne razlike u prezentaciji bolesti ili preživljavanju, osim u starijoj dobi i nižem opterećenju tumorom pri postavljanju dijagnoze kod žena. Ženski spol pojedinačno nije prediktor preživljenja [84]□ . Utvrđeno je također da je obostrana ovarijektomija povezana sa značajno povećanim rizikom nastanka HCC-a, što nije povezano s kraćom izloženošću endogenim hormonima ili primjenom hormonskog nadomjesnog liječenja u menopauzi. Nije se našlo povezanosti između oralnih kontraceptiva i HCC-a. Također nije nađena povezanost između broja poroda, starosti žene pri prvom porodu, dobi menopauze ili

trajanja fertiliteta [85]□ . Smanjena razina adiponektina je uzrok pojačanog rizika karcinoma jetre kod muškaraca. Testosteron aktivira protein JNK (od engl. *c-Jun N-terminal kinase* – JNK) kod miševa i u humanim adipocitima. Inhibicija adiponektina posredovana s JNK proteinima uzrokuje proliferaciju malignih stanica jetre, jer adiponektin štiti od nastanka jetrenog karcinoma preko aktivacije AMP [86]□ . Nedavno je dokazan zaštitni učinak estrogena protiv HCC-a koji je jaki endogeni antioksidans preko snižavanja ekspresije IL6 i inhibicije tumorom povezanih makrofaga (od engl. *Tumor associated macrophage* – TAM) [87].

Protuupalni učinak estrogena je dobro istražen. Estrogen, ovisno o svojoj koncentraciji ili vrsti stanica na koje utječe, ima imunomodularni učinak što se posebno vidi tijekom menopauze kod žena kada se značajno smanji koncentracija estrogena [88]. Ako B-stanični imunitet ili fibroza tkiva ne igraju ključnu ulogu u obnovi tkiva, estrogen bi mogao imati zaštitnu ulogu u kroničnom upalnom procesu. Estrogen može kočiti NF-κB put i blokirati ekspresiju adhezijskim molekulama. Produkcija upalnih čimbenika, kao što su dušični oksid (NO) i ROS su smanjeni u upalnom okolišu [89]□ .

Relativni porast visceralnog masnog tkiva kod muškaraca bi mogao objasniti spolne razlike kod HCC-a, kao što je u jednoj studiji prikazana povezanost BMI i rizik od ponovnog razvoja HCC-a nakon LTX kod muškaraca [90]. U slučaju HBV i HCV infekcije, dokazano je da ženski spol ima zaštitni učinak protiv HCC-a jer estrogen snižava upalno povišenu razinu IL6 i nastanak virusa [91]. Razlike u metabolizmu među spolovima mogu doprinijeti razlikama u HCC-u. Visceralni adipozitet, češći kod muškaraca, inducira proupalno stanje koje može povećati rizik od nastanka fibroze u odnosu na žene. Estrogenska zaštita se gubi u postmenopauzi pa se u ovoj životnoj dobi povećava broj NASH oboljenja kod žena u odnosu na muškarce. Starije žene s HCC-om češće obolijevaju od NASH i često se može dogoditi previd radi trenutnih smjernica liječenja i praćenja. Spolne razlike mogu pružiti podršku za buduća istraživanja spolno ovisnih prevencija nastanka HCC-a [92]□ .

Unatoč značajnim demografskim razlikama u NASH grupama, karakteristike jetre i tumora su usporedne. NASH-HCC bolesnici stariji su u odnosu na bolesnike s alkoholno nastalim HCC-om (72±9 godina u odnosu na 66±9 godina,  $p<0.001$ ), manja je predominacija muškog spola (65% naspram 98%,  $p<0.001$ ), manja je prevalencija ŠB u NASH-HCC (78% naspram 36%,  $p<0.001$ ) te je povišeni krvni tlak u NASH-HCC grupi (80% naspram 58%,  $p<0.001$ ) [73]. Vrijednosti funkcionalnih jetrenih testova su bili podjednaki. Većini bolesnika bolest je

kasno utvrđena, nepogodna za lokoregionalno liječenje. Kvalitetnija karakterizacija bolesnika s NASH-om i alkoholnom bolesti jetre potrebni su radi optimiziranog probira, praćenja i plana liječenja bolesnika [93]□ .

Rano postavljanje dijagnoze i liječenje HCC-a predstavljaju izazov jer patogeneza HCC-a nije do kraja istražena. Promjene u alkoholu izazvanim povišenim vrijednostima šećera su prisutne u ranom stadiju HCC-a u odnosu na zdravo tkivo jetre. U krvi, povišene vrijednosti šećera izazvane alkoholom različite su uspoređujući HCC i kronične jetrene bolesti gledano preko ROC (Receiver Operating Characteristic) krivulje 0.85 u odnosu na 0.65 kad se usporedi s  $\alpha$ -fetoproteinom kao standardnim biološkim biljekom HCC-a. Vrijednosti šećera linearno rastu gledano od zdravih osoba u odnosu na oboljele od kronične jetrene bolesti, ranih stadija HCC-a i kasnih stadija HCC-a. Porast vrijednosti šećera upućuje na moguću ulogu aldo-keto reduktaze u patogenezi HCC-a, otvarajući mogućnosti nove dijagnostike i opcija liječenja nakon potvrde oboljenja [94]□ .

Detaljnijim istraživanjem utjecaja konzumacije kave u patogenezi HCC-a je utvrđeno da kava ima koristan učinak u prevenciji jetrenih oboljenja, uključujući i HCC [95]. Pijenje kave prema jednoj pretpostavci upućuje da snižava serumske razine  $\gamma$ -glutamiltransferaze (GGT), koji je povezan s nižom incidencijom nastanka HCC-a. Procjenjuje se da na razvoj HCC-a u više od 80% slučajeva imaju utjecaj četiri glavna čimbenika koji se mogu izbjeći. Teško je davati preporuke pravilne prehrane, jer nije utvrđeno da konzumacija velikih količina antioksidansa smanjuje rizik od nastanka HCC-a. Hrana bogata višestruko nezasićenim masnim kiselinama i vjerojatno  $\beta$ -karoten mogu smanjiti rizik od nastanka HCC-a, za razliku od hrane bogate ugljikohidratima i nastanka ciroze i ŠB [96]□ .

## **2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je odrediti mogući mehanizam kojim upalno izazvana smrt stanice putem LPO uzrokuje razvoj HCC-a u odsutnosti virusne infekcije. Uz to cilj je istražiti na koji način molekularna patogeneza virusa utječe na nastanak hepatocelularne ozljede koja započinje programirani upalni odgovor unutar jetre, regenerativnu hiperplaziju, te progresiju u tumor. Ovim podciljevima će se istražiti da li na mehanizam nastanka HCC-a utječe samo virusna upala uz prisutne prateće tumoru pridružene makrofage i LPO ili je mehanizam nastanka HCC-a povezan i s vanjskim čimbenicima rizika (npr. alkohol, pušenje, pretilost, dob i spol) i njihovom LPO.

## **2.2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Oksidacijsko oštećenje tkiva jetre je zbog upale značajno povišeno kod virusnih oboljenja u odnosu na alkoholnu etiologiju. Kako se u mikrookolišu tumora, pa tako i HCC-a nalaze različite stanice s promijenjenom funkcijom (npr. fibroblasti, endotelne i upalne stanice, periciti), pretpostavka je da tumoru pridruženi makrofagi su dodatni čimbenik koji razlikuje infekciju i upalu u razvoju HCC-a. Pretpostavka je da će vanjski čimbenici pridonijeti razvoju oksidacijskog stresa kod upale te će se prema tome dodatno razjasniti mehanizam nastanka HCC.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

Ispitanici koji su uključeni u istraživanje primljeni su u Kliničku bolnicu Merkur u Zagrebu, uz protokole usklađene s etičkim standardom Deklaracije iz Helsinkija iz 1975. godine te s modifikacijama iz 1983. godine, a odobrenog od strane Etičkog povjerenstva KB Merkur UR.BR. 03/1-3578.

Identiteti ispitanika koji su uključeni u istraživanje poznati su samo voditelju i zaštićeni su posebnim kodovima, koji su dio bolničkog protokola kojim se vode histološki uzorci ispitanika. Klinički i laboratorijski podaci dobiveni su iz osobnih kartona ispitanika Klinike za kirurgiju, anestezioloških intraoperativnih lista te terapijskih lista iz Jedinice intenzivnog liječenja Odjela za anesteziju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KB Merkur.

Retrospektivno istraživanje obuhvatilo je bolesnike Klinike za kirurgiju, Odjela za anesteziju i intenzivno liječenje te Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur od 2007. do 2015. godine, te je izdvojeno ukupno 153 ispitanika sa slijedećim dijagnozama: alkoholna ciroza (EtOH), alkoholna ciroza s hepatocelularnim karcinomom (EtOH HCC), hepatitis B virus (HBV), hepatitis B virus s hepatocelularnim karcinomom (HBV HCC), hepatitis C virus (HCV), hepatitis C virus s hepatocelularnim karcinomom (HCV HCC). Budući da je nastanak hepatocelularnog karcinoma usko povezan s cirozom jetre te s HBV i HCV infekcijama, uz nisku incidenciju pojedinih virusnih infekcija, u nekim grupama bolesnika nije bilo moguće naći veći broj ispitanika za našu studiju. Iz bolničke arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju uzeti su parafinski uzorci tkiva jetre te su narezani za imunohistokemijska istraživanja.

Imunohistokemijska bojanja provedena su u Laboratoriju za oksidacijski stres Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.



### 3.2. METODE

U sklopu obrade za postupak LTX, svim bolesnicima se protokolirano učini dijagnostička obrada. Svi analizirani podaci su preuzeti iz medicinske dokumentacije ispitanika.

Velika većina svih bolesnika, uz jetreno zatajenje, ima i pridružene bolesti. Predoperativna procjena bolesnika zahtijeva multidisciplinarni pristup. To uključuje procjenu jetrene disfunkcije i možebitne nastale komplikacije jednako kao i pridružene bolesti, bolesnikove motivacije za liječenjem te podršku obitelji.

#### Kardijalna evaluacija

Kardijalna procjena bolesnika se razlikuje među transplantacijskim centrima. Minimum je EKG (elektrokardiogram) i transtorakalni ultrazvuk srca (od engl. *Transthoracal echocardiogram* – TTE) koji se moraju učiniti kod svih bolesnika. Često je potrebno učiniti cjelokupnu funkcionalnu procjenu kardijalne rezerve i alkoholom nastale kardiomiopatije. Incidencija koronarne bolesti (od engl. *Coronary Artery Disease* – CAD) je 5-26% među bolesnicima koji se planiraju za postupak LTX. Bolesnike sa prisutnim čimbenicima rizika, kao što su ŠB, NASH, znana CAD i periferna vaskularna bolest, treba dodatno obraditi. Dobutamin stres miokardijalni perfuzijski slikovni prikaz te dobutamin stres ehokardiografija (od engl. *Dobutamin Stress Echocardiogram* – DSE) mogu pomoći prilikom prepoznavanja bolesnika sa značajnim ishemijskim bolestima srca, posebice kod bolesnika kod kojih nije moguće provesti testiranje funkcionalnog kapaciteta. CAD je povezana s visokim mortalitetom (50%) i morbiditetom (81%) pri LTX radi čega bi DSE trebala biti sastavni dio rutinske predtransplantacijske obrade bolesnika.

#### Plućna evaluacija

Plućne komplikacije nastale kao posljedica jetrene bolesti su restriktivna bolest pluća zbog nastalih pleuralnih izljeva, intrapulmonalnih „shuntova“, ventilacijsko-perfuzijskih poremećaja (od engl. *Ventilation/Perfusion ratio* – V/Q) i plućne hipertenzije. Rendgenska snimka srca i pluća te funkcionalni testovi pluća mogu otkriti već postojeću plućnu bolest. Iznimno je bitno otkriti hepatopulmonalni sindrom te portopulmonalnu hipertenziju obzirom da su odgovorni za jednu od postoperativnih komplikacija.

U istraživanju su bili uključeni slijedeći parametri:

Parametri primatelja: dob, spol, etiologija ciroze, visina, težina, indeks tjelesne težine (od engl. *Body mass indeks* – BMI), krvna grupa, alkohol, pušenje, pridružene bolesti (AH i ŠB – numeričke vrijednosti krvnoga tlaka kao ni vrijednost šećera u krvi nisu praćene), lijekovi.

Laboratorijski parametri na dan transplantacije: leukociti (L), hemoglobin (Hgb), trombociti (Trc), neutrofilni (Neu), limfociti (Ly), monociti (Mo), protrombinsko vrijeme (PV), internacionalni omjer protrombinskog vremena (od engl. *International normalized ratio* – INR), aktivirano parcijalno trombotičko vrijeme (APTV), fibrinogen, albumini, kalij (K), natrij (Na), urea, kreatinin, C-reaktivni protein (CRP), ukupni bilirubin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (ALP). Osim standardnih predoperativnih laboratorijskih parametara pred veliki kirurški zahvat, praćeni su i: kolinesteraza (ChE), ukupni kolesterol, indeks ateroskleroze (omjer triglicerida/HDL kolesterola – od engl. *High density lipoprotein* – HDL) dobiven kao automatski laboratorijski izračun, pojedinačne vrijednosti triglicerida i HDL kolesterola nisu u ovom radu praćene, željezo, TIBC (od engl. *Total Iron Binding Capacity* – TIBC), UIBC (od engl. *Unsaturated Iron Binding Capacity* – UIBC), saturacija transferina učinjeni na dan transplantacije i 1 mjesec nakon transplantacije.

Uzorci su pripremljeni i obojeni prema standardnim metodama pripreme histološkog preparata za dijagnostiku svjetlosnim mikroskopom. Bioptičke uzorke analizirao je iskusni i neovisni patolog, specijaliziran u području transplantacije jetre.

MELD (od engl. *Model For End Stage Liver Disease*) bodovni sustav je razvijen 2003. godine kako bi se njime procijenila 3 mjesечna smrtnost bolesnika s uznapredovalom bolesti jetre [97].

Tablica 4. MELD bodovni sustav

MELD score	Očekivano 6 mjesечно preživljenje	Očekivano 12-mjesечно preživljenje	Očekivano 24-mjesечно preživljenje
0-9	98%	93%	90%
10-19	92%	86%	80%
20-29	78%	71%	66%
30-39	40%	37%	33%

### 3.2.1. PRIPREMA PATOHISTOLOŠKIH PREPARATA

Tkivo jetre koje je uzeto za patološku obradu fiksirano je u 10% puferiranom formalinu, dehidrirano je kroz uzlazni gradijent alkohola (70% etanol, 96% etanol i apsolutni etanol), te je dodatno dehidrirano u ksilenu i prožeto parafinom. Nakon što je tkivo prožeto parafinom, konačno je fiksirano u parafinske kocke kako bi se moglo rezati na ultratanke rezove od 4 µm. Rezovi su fiksirani na predmetna stakalca nakon čega je slijedilo imunohistokemijsko bojanje.

### 3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE I ANALIZA

Imunohistokemijskim bojanjem pratila se izraženost biljega LPO akroleina i HNE-a te biljega aktivacije makrofaga CD68.

Preparati na predmetnim stakalcima su rehidrirani uranjanjem u ksilen, a zatim u silazni gradijent alkohola (apsolutni etanol, 96% etanol i 70% etanol) te su konačno rehidrirani u

destiliranoj vodi. Nakon što su membrane dodatno permeabilizirane 2 minute u metanolu, ostaci su se isprali u PBS-u te je dalje slijedila detekcija ciljanog antigena.

Proizvod lipidne peroksidacije, akrolein, vizualiziran je monoklonskim protutijelima iz miša na akrolein-lizinski konjugat, ustupljen ljubaznošću prof. Koji Uchide iz Laboratory of Food and Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan. Uzorci su nakon ispiranja PBS-om inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi s anti-akrolein-lizin protutijelima u razrjeđenju 1:10 u PBS/1%BSA. Nakon 2 sata su primarna protutijela isprana tri puta po 5 minuta PBS-om te su zatim inkubirana s 3% vodikovim peroksidom 20 minuta u mraku radi inhibicije endogenih peroksidaza. Nakon inhibicije peroksidaza, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u Tris fosfatnom puferu (TBS) te su inkubirani 30 minuta s EnVision sekundarnim protutijelom (DAKO, Danska). Po završetku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta TBS-om. Prisutnost akrolein-lizinskih konjugata vizualizirana je dodatkom 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB, Dako), koji na mjestu vezivanja protutijela daje smeđi talog. Iz ovako pripremljenih uzoraka napravljeni su trajni preparati dehidracijom kroz uzlazni gradijent alkohola (70% etanol, 96% etanol i apsolutni etanol) te ksilen i konačno uklapanjem u Kanada Balzam.

Drugi proizvod lipidne peroksidacije, HNE, vizualiziran je monoklonskim protutijelima iz miša na HNE-histidinski konjugat, ustupljen ljubaznošću prof. Georga Waega, Sveučilišta Karl-Franzens, Graz, Austrija. Uzorci su nakon ispiranja PBS-om inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi s anti-HNE-histidin protutijelima u razrjeđenju 1:10 u PBS/1%BSA. Nakon 2 sata primarna protutijela su isprana tri puta po 5 minuta PBS-om te su zatim inkubirana s 3% vodikovim peroksidom 20 minuta u mraku radi inhibicije endogenih peroksidaza. Nakon inhibicije peroksidaza, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u Tris fosfatnom puferu (TBS) te su inkubirani 30 minuta s EnVision sekundarnim protutijelom (DAKO, Danska). Po završetku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta TBS-om. Prisutnost akrolein-lizinskih konjugata vizualizirana je dodatkom 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB, Dako), koji na mjestu vezivanja protutijela daje smeđi talog. Iz ovako pripremljenih uzoraka napravljeni su trajni preparati dehidracijom kroz uzlazni gradijent alkohola (70% etanol, 96% etanol i apsolutni etanol) te ksilen i konačno, uklapanjem u Kanada Balzam.

Biljeg aktivacije makrofaga CD68, vizualiziran je monoklonskim protutijelom iz miša anti-CD68 (MA513324, ThermoFisher Scientific, SAD). Nakon rehidracije uzroke je bilo potrebno termički obraditi u citratnom puferu pH 6.0 na temperaturi od 85 °C 30 minuta kako bi se otkrio antigen. Nakon otkrivanja antigena, slijedilo je ispiranje PBS-om te inkubacija primarnim protutijelom anti-CD68 preko noći na sobnoj temperaturi s razrjeđenjem 1:100 u PBS/1% BSA. Nakon inkubacije, primarna protutijela isprana su tri puta po 5 minuta PBS-om te su zatim inkubirana s 3% vodikovim peroksidom 20 minuta u mraku radi inhibicije endogenih peroksidaza. Nakon inhibicije peroksidaza, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u Tris fosfatnom puferu (TBS) te su inkubirani 30 minuta s EnVision sekundarnim protutijelom (DAKO, Danska). Po završetku inkubacije, uzorci su isprani tri puta po 5 minuta TBS-om. Prisutnost CD68 vizualizirana je dodatkom 3.3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB, Dako), koji na mjestu vezivanja protutijela daje smeđi talog. Iz ovako pripremljenih uzoraka napravljeni su trajni preparati dehidracijom kroz uzlazni gradijent alkohola (70% etanol, 96% etanol i apsolutni etanol) te ksilen i konačno uklapanjem u Kanada Balzam.

Prisutnost akroleina, HNE-a i CD68 u tkivima jetre analizirao je patolog pomoću svjetlosnog mikroskopa (tip Olympus BX51 s pripadajućom digitalnom kamerom DP70 i softverom za analizu slike). Za akrolein i HNE pratile su se izraženosti u pojedinim vrstama stanica jetre po jačini i postotku pozitiviteta u jezgri i citoplazmi stanica. CD68 praćen je u makrofagima i pigmentofagima. Analiza je izvršena na najmanje 5 vidnih polja velikog povećanja 400x. Analizirana je prisutnost citoplazmatske, nuklearne ili miješane izraženosti. Određen je intenzitet akroleina, HNE i anti-NRF2 bojanja: 0 = negativno, 1+ = slabo, vidljivo na povećanju 400x, 2+ = srednje, vidljivo na povećanju 100x i 3+ = jako, vidljivo na povećanju 40x.

### **3.2.3. STATISTIČKA ANALIZA**

Za statističke analize korišten je računalni program Prism GraphPad, verzija 8.0 (GraphPad Software, SAD, 2020.). Korišteni su slijedeći statistički testovi: Studentov T test, te  $\chi^2$  test i one-way ANOVA za multivarijantnu analizu parametara. Rezultati su opisani aritmetičkom

sredinom, standardnom pogreškom aritmetičke sredine te prosjekom za prikaz zbirnih vrijednosti atributivnih varijabli, a kao značajne uzete su razlike s  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. ISPITANICI

Ispitanici su bili obrađeni u Kliničkoj bolnici Merkur u Zagrebu u periodu od 2007. do 2015. godine uz odobrenje Etičkog povjerenstva KB Merkur (UR.BR. 03/1-3578) te je u potpunosti u skladu s etičkim standardom Deklaracije iz Helsinkija iz 1975. godine te njezinim modifikacijama iz 1983. godine.

Istraživanje je obuhvatilo bolesnike Klinike za kirurgiju, Odjela za anesteziju i intenzivno liječenje te Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur od 2007. do 2015. godine, ukupno 153 ispitanika je podijeljeno prema dijagnozama u grupe: alkoholna ciroza (EtOH), alkoholna ciroza s hepatocelularnim karcinomom (EtOH HCC), hepatitis B virus (HBV), hepatitis B virus s hepatocelularnim karcinomom (HBV HCC), hepatitis C virus (HCV), hepatitis C virus s hepatocelularnim karcinomom (HCV HCC). Kako je HCC usko povezan s cirozom jetre koja je povezana s HBV i HCV infekcijama, u nekim grupama nije bilo moguće naći veći broj ispitanika zbog niske incidencije pojedinih virusnih infekcija. Podaci za ispitanike nalaze se u tablici 5.

Tablica 5. Statistički podaci za ispitanike

<b>KARAKTERISTIKE</b>	<b>BROJ ISPITANIKA: 153</b>
EtOH	44
EtOH HCC	21
HBV	13
HBV HCC	7
HCV	30
HCV HCC	22
HCC	16

PUŠENJE	31
BMI (body mass index)	Pothranjenost <18: 1 Normalno 18.5-24.9: 35 Prekomjerna težina 25-29.9: 87 Pretilost >30: 30
DOB	>30: 1 >40: 6 >50: 40 >60: 74 >70: 30 >80: 2
SPOL	M: 128 Ž: 25
KRVNA GRUPA	A: 52 B: 26 AB: 7 0: 68
ŠEĆERNA BOLEST tip 2	35
LEUKOCITI <4 ili >10	58
CRP (>5)	68
MONOCITI <0.2 ili > 0.8	25
AST (>38)	106
GGT (>55)	69
Alfa fetoprotein (>5.8)	50



Tablica 6. MELD bodovni sustav prema etiologiji zatajenja jetre ispitanika ovoga rada u vremenskom razdoblju 2007. do 2015.godine

<b>ETIOLOGIJA</b>	<b>PROSJEČNI MELD SCORE</b>
EtOH	20.7
EtOH HCC	14.3
HBV	22.1
HBV HCC	11.8
HCV	22.5
HCV HCC	12.2
HCC	16.05

EtOH (Alkoholna ciroza), EtOH HCC (alkoholna ciroza s hepatocelularnim karcinomom), HBV (hepatitis B virus), HBV HCC (hepatitis B virus s hepatocelularnim karcinomom), HCV (hepatitis C virus), HCV HCC (hepatitis C virus s hepatocelularnim karcinomom), HCC (hepatocelularni karcinom)

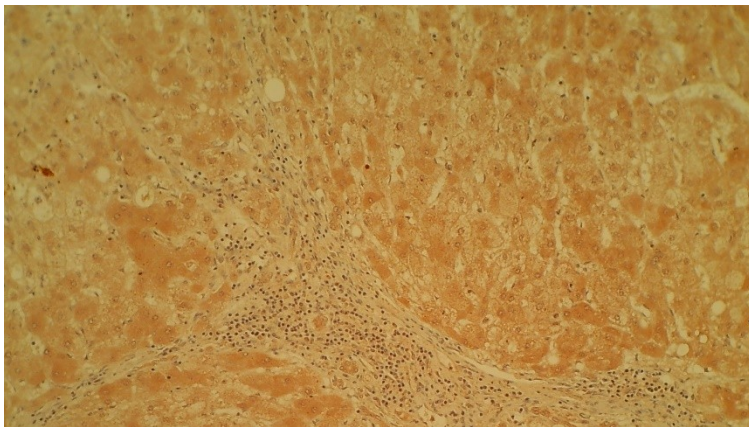
Tablica 7. MELD bodovni sustav prema etiologiji jetrenog zatajenja naših ispitanika u vremenskom razmaku 2007. do 2015.godine

<b>ETIOLOGIJA</b>	<b>MELD 20-29</b>	<b>MELD 30-39</b>
EtOH	38%	14.2%
EtOH HCC	13.6%	0
HBV	36.3%	27.2%
HBV HCC	14.2%	0
HCV	11.5%	19.2%
HCV HCC	4.5%	0
HCC	0	17.6%

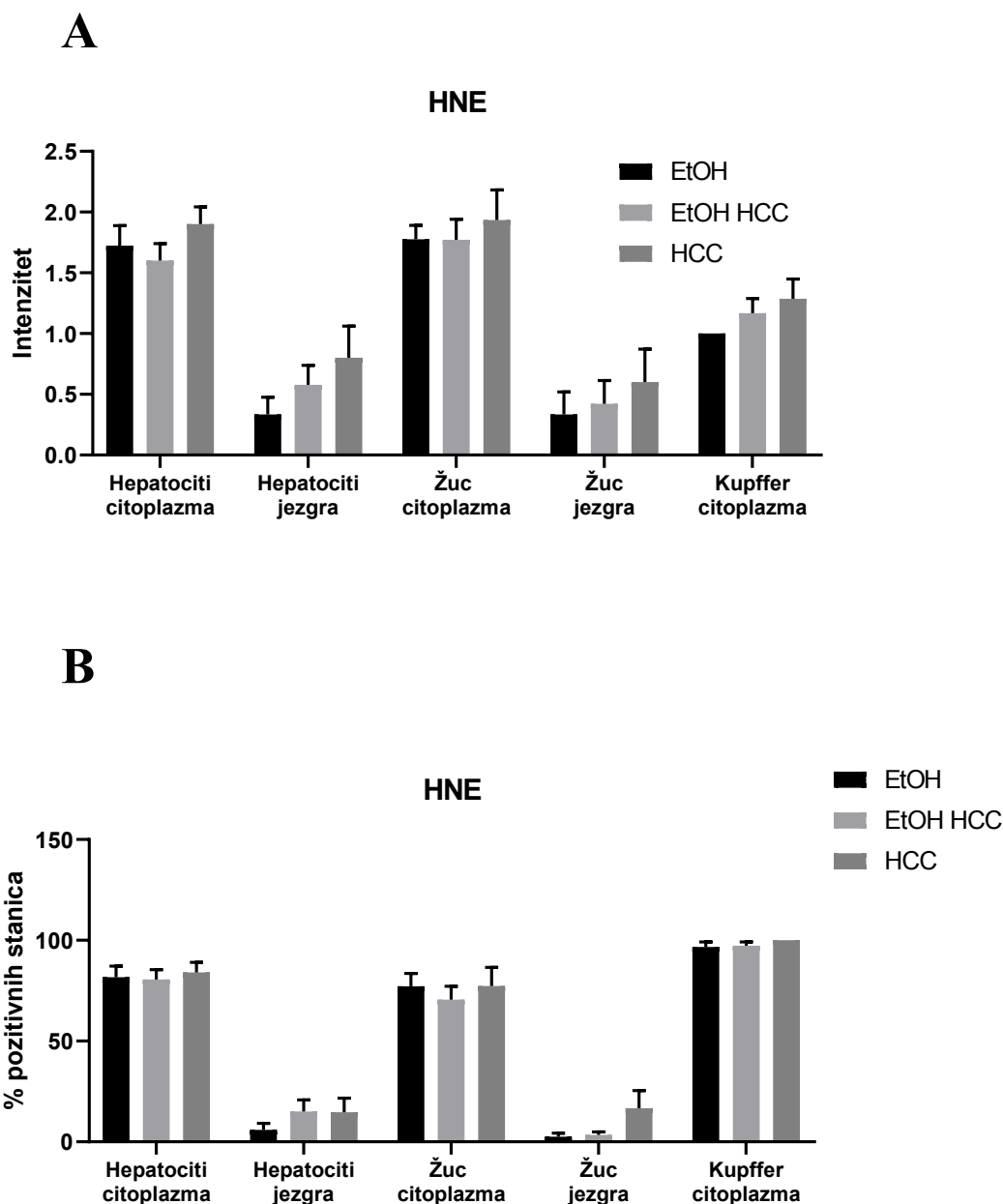
EtOH (Alkoholna ciroza), EtOH HCC (alkoholna ciroza s hepatocelularnim karcinomom), HBV (hepatitis B virus), HBV HCC (hepatitis B virus s hepatocelularnim karcinomom), HCV (hepatitis C virus), HCV HCC (hepatitis C virus s hepatocelularnim karcinomom), HCC (hepatocelularni karcinom)

#### 4.2. ANALIZA PRISUTNOSTI HNE-a

Kako bi odredili ulogu HNE-a u patologiji HCC-a ovisno o vanjskim čimbenicima, analizirani su intenzitet i postotak pozitivnih stanica pojedinih dijelova u tkivu jetre, točnije analiziran je HNE pozitivitet u hepatocitima (jezgra, citoplazma), stanicama žuči (jezgra, citoplazma) i Kupfferovim stanicama (citoplazma) (Slika 6). Rezultati su analizirani po etiologiji te su rezultati ispitanika s EtOH, EtOH HCC i HCC prikazani na slici 7. HNE se u svim uzorcima raspoređuje značajno više u citoplazmi nego u jezgri, i po intenzitetu i po postotku pozitivnih stanica. Gledano prema skupinama, HCC skupina se posvuda najintenzivnije boja iako ove razlike nisu statistički značajne. Najslabiji intenzitet bojanja među citoplazmama se nalazi u citoplazmama Kupfferovih stanica, uz najveći broj HNE pozitivnih stanica (>90%). Intenzitet HNE obojenja pokazuje trend porasta u hepatocitima kod HCC-a u odnosu na EtOH i EtOH HCC, ali, nema statističke značajnosti. Sličan trend je i u citoplazmama stanicama žuči, opet, bez statističke značajnosti, najintenzivnije je obojao HCC (1.8) u citoplazmi hepatocita, najslabije EtOH HCC skupinu. Intenzitet HNE pozitiviteta u jezgrama hepatocita i stanica žuči raste kod HCC-a, međutim isto bez značajnosti među grupama. Kod Kupfferovih stanica nije bilo HNE-a u jezgrama. Zanimljivo, citoplazme i hepatocita i stanica žuči i Kupfferovih stanica imale su izrazito visok postotak pozitiviteta.

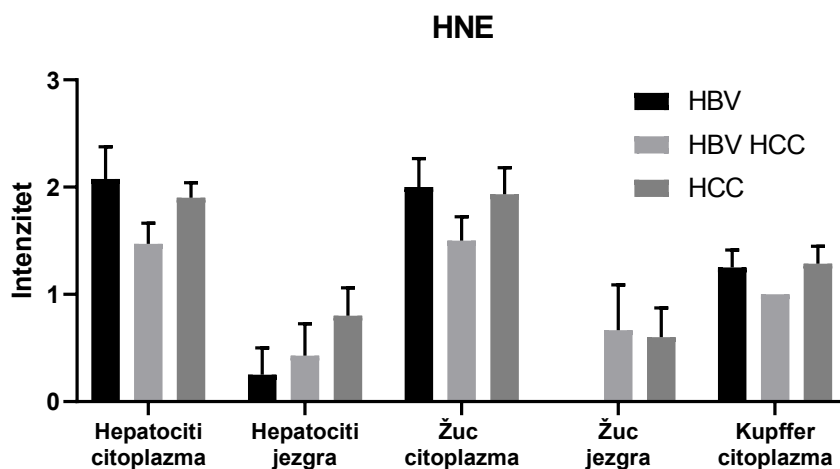
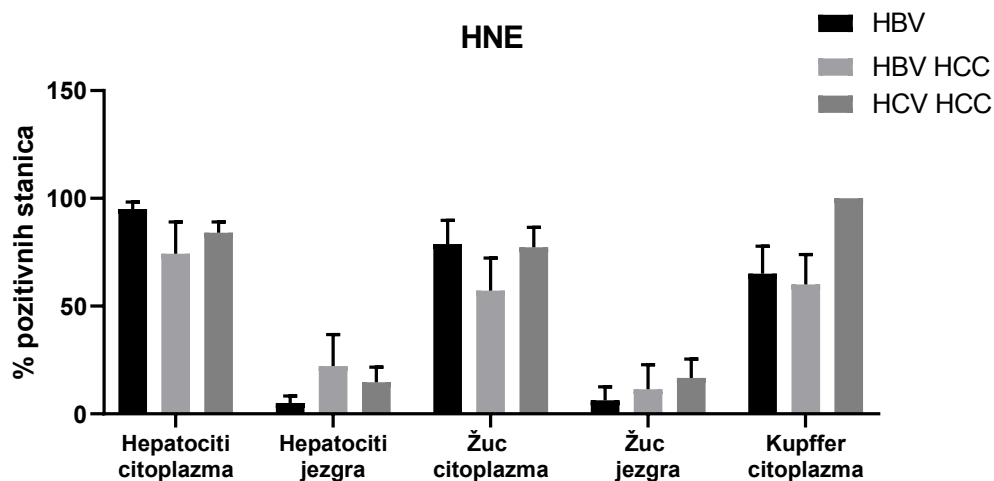


Slika 6. Imunohistokemijsko bojanje na HNE proteinske konjugate, reprezentativna slika (100x). Smeđe obojenje prikazuje prisutnost HNE-a.



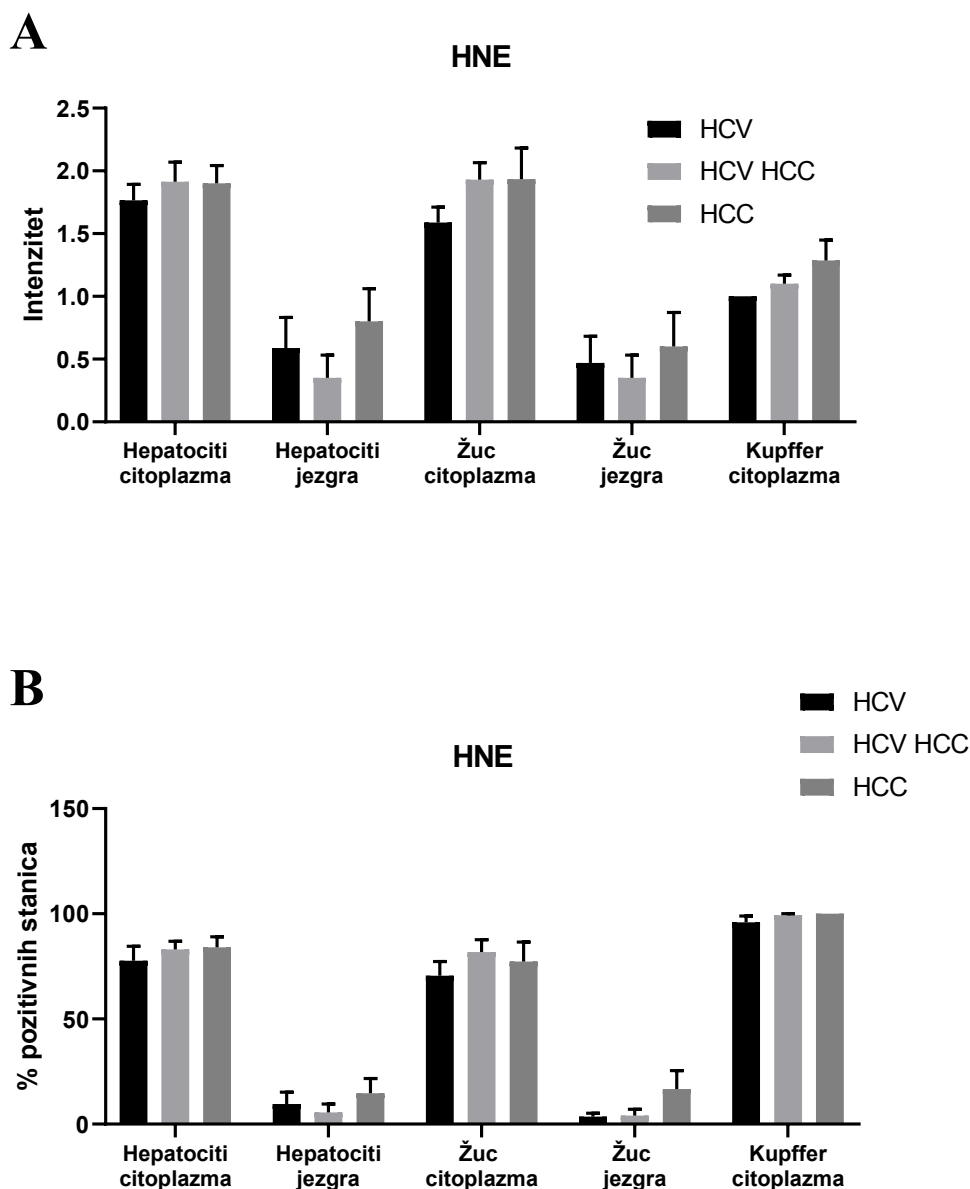
Slika 7. Intenzitet (A) i postotak (B) HNE pozitiviteta u jetri ispitanika s alkoholnom (EtOH) etiologijom. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

Kod ispitanika s infekcijom HBV virusa (Slika 8) trend najnižeg intenziteta HNE-pozitiviteta nalazi se u grupi s infekcijom HBV-om i HCC-om u hepatocitima, stanicama žuči i Kupfferovim stanicama, međutim zbog izuzetno malog broja uzoraka ove razlike nisu statistički značajne. Postotak pozitiviteta, kao i kod alkoholne etiologije je izuzetno visok i bez razlike među skupinama. Nasuprot citoplazmama, nalazi se mali broj pozitivnih jezgri s niskim intenzitetom. Kupfferove stanice nemaju HNE-a u jezgrama niti u jednoj grupi.

**A****B**

Slika 8. Intenzitet (A) i postotak (B) HNE pozitiviteta u jetri ispitanika s HBV etiologijom. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

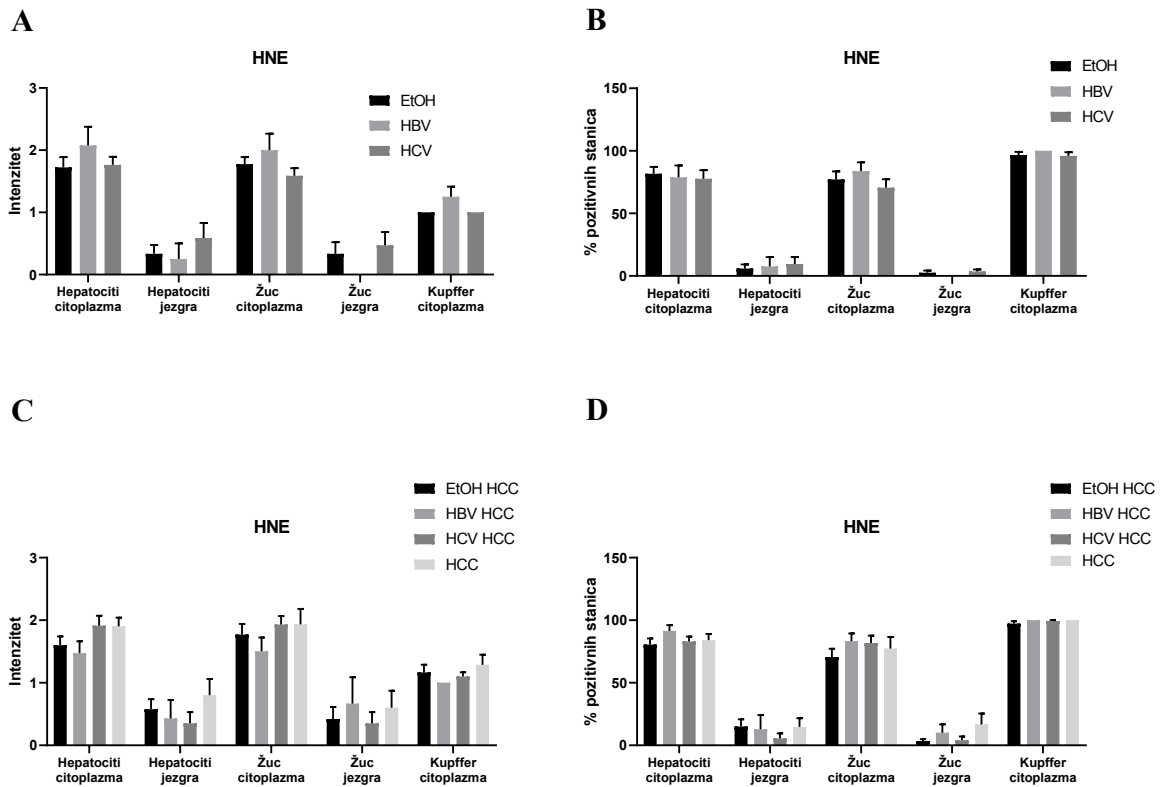
HNE pozitivitet kod ispitanika s HCV etiologijom prikazan je na slici 9. Zanimljivo, sama HCV infekcija ima niži, iako ne značajno, HNE pozitivitet u odnosu na HCC s ili bez HCV infekcije. Kao i u predhodnim analizama, jezgre imaju niski intenzitet pozitiviteta, dok su jezgre Kupfferovih stanica negativne. Postotak pozitivnih citoplazmi je izrazito visok, dok je postotak pozitivnih jezgri nizak.



Slika 9. Intenzitet (A) i postotak (B) HNE pozitiviteta u jetri ispitanika s HCV etiologijom. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

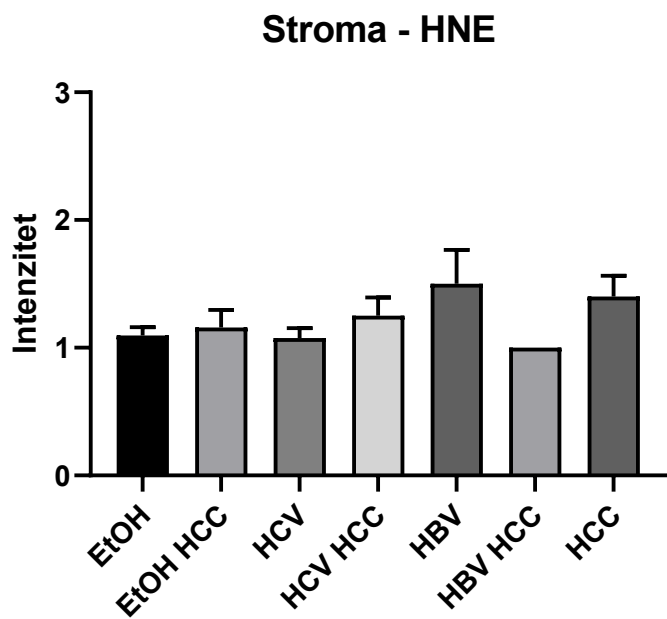
Slijedeće su uspoređene grupe s i bez HCC (Slika 10). U području citoplazme hepatocita se kod čimbenika rizika najintenzivnije obojala HBV skupina, dok su najpozitivnija bojanja HBV infekcije bila u području citoplazme Kupfferovih stanica (>90%), međutim bez statističke značajnosti. U HCC skupini HCV HCC i HCC se najintenzivnije bojavu u citoplazmi hepatocita dok je podjednako najveći pozitivitet bojanja u području citoplazme

Kupfferovih stanica (>95%) kod svih skupina podjednako visok (EtOH HCC, HBV HCC, HCV HCC i HCC). Najslabiji intenzitet bojanja ima EtOH HCC skupina u jezgri žuči. EtOH HCC dominira intenzitetom bojanja i u području citoplazme i u području jezgre dok samo EtOH skupina dominira intenzitetom bojanja u području jezgre hepatocita, u ostalima dominira HBV skupina.



Slika 10. Intenzitet (A, C) i postotak (B, D) HNE pozitiviteta u jetri ispitanika se uspoređuju čimbenici rizika – HBV, HCV infekcija i EtOH (A, B) s HCC-om nastalim pri HBV i HCV infekciji te kod EtOH skupine (C, D). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE; p>0.05

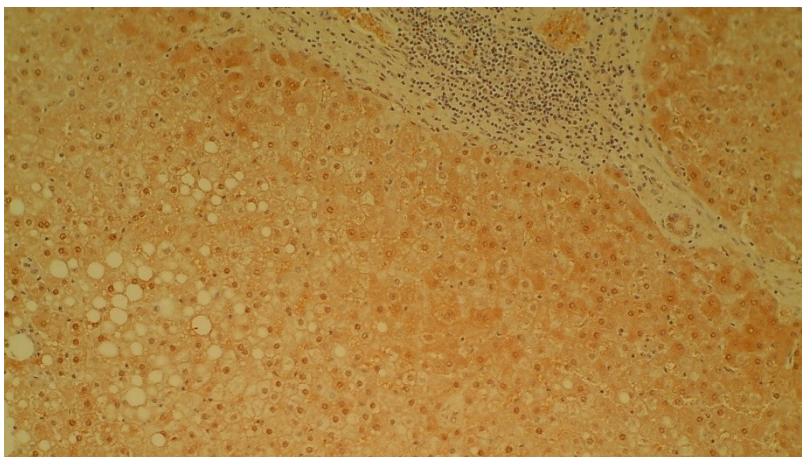
Gledajući intenzitet HNE pozitiviteta strome, razvidno je da HBV ima najjači intenzitet dok s druge strane HBV HCC skupina imaju najslabiji intenzitet bojanja. Sve skupine izuzev HBV HCC-a imaju intenzitet bojanja između 1-1.5, iako opisane razlike ukazuju na trend i nisu statistički značajne.



Slika 11. Usporedba HNE intenziteta bojanja u području strome čimbenika rizika i nastalog HCC-a. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

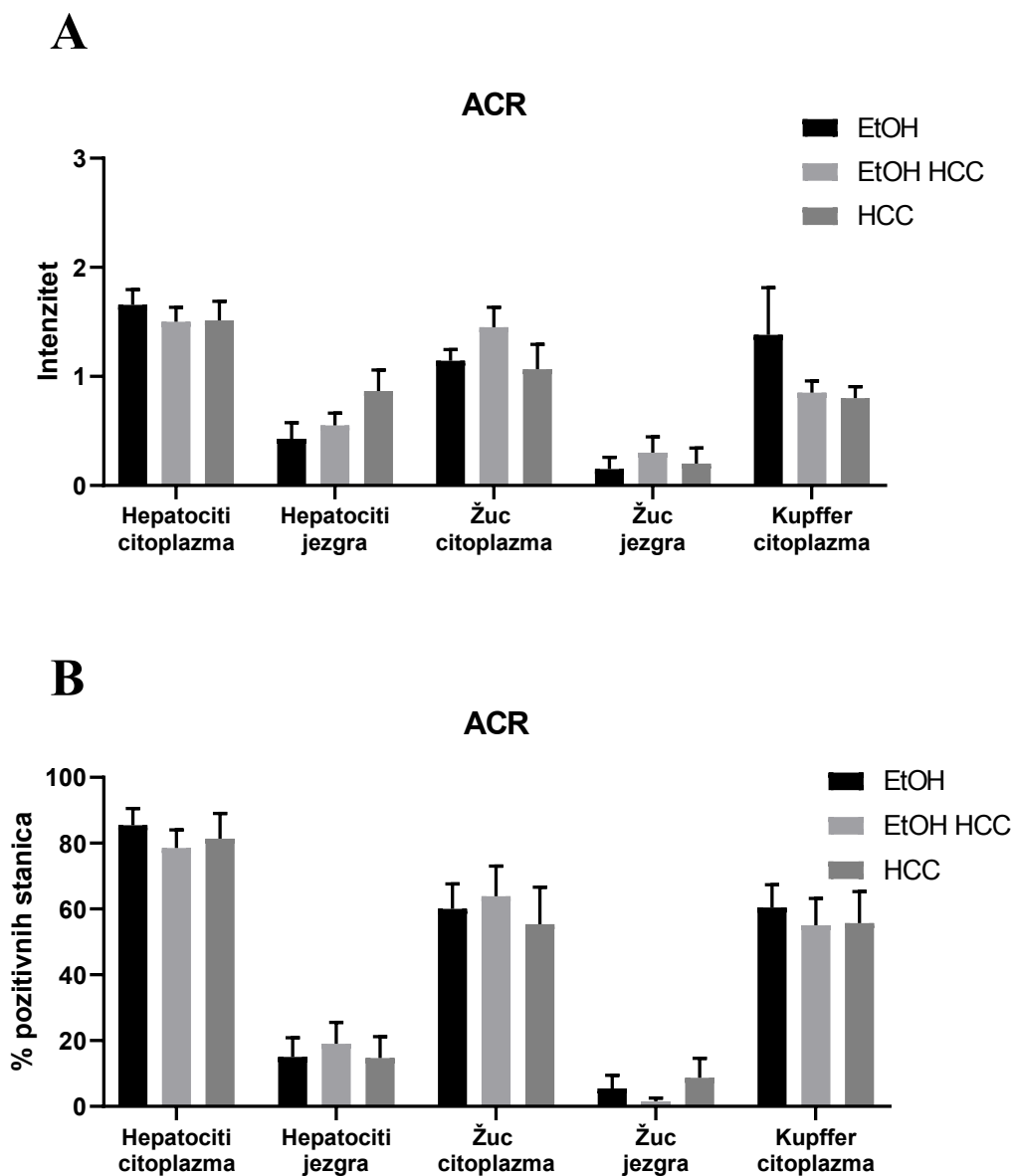
### 4.3. ANALIZA PRISUTNOSTI AKROLEINA

Kako bi odredili ulogu akroleina u patologiji HCC-a ovisno o vanjskim čimbenicima, analizirani su intenzitet i postotak pozitivnih stanica pojedinih dijelova u tkivu jetre, točnije analiziran je pozitivitet akroleina u hepatocitima (jezgra, citoplazma), stanicama žuči (jezgra, citoplazma) i Kupfferovim stanicama (citoplazma) (Slika 12). Gledajući alkoholnu etiologiju (Slika 13), akrolein je prisutan u citoplazmama hepatocita, stanica žuči i Kupfferovih stanica sa srednjim intenzitetom i relativno visokim udjelom pozitivnih stanica (kod svih >60%). Kao i kod HNE-a, jezgre Kupfferovih stanica su negativne, a intenzitet i postotak pozitivnih jezgri je izrazito nizak. Međutim, među grupama nema statistički značajne razlike.



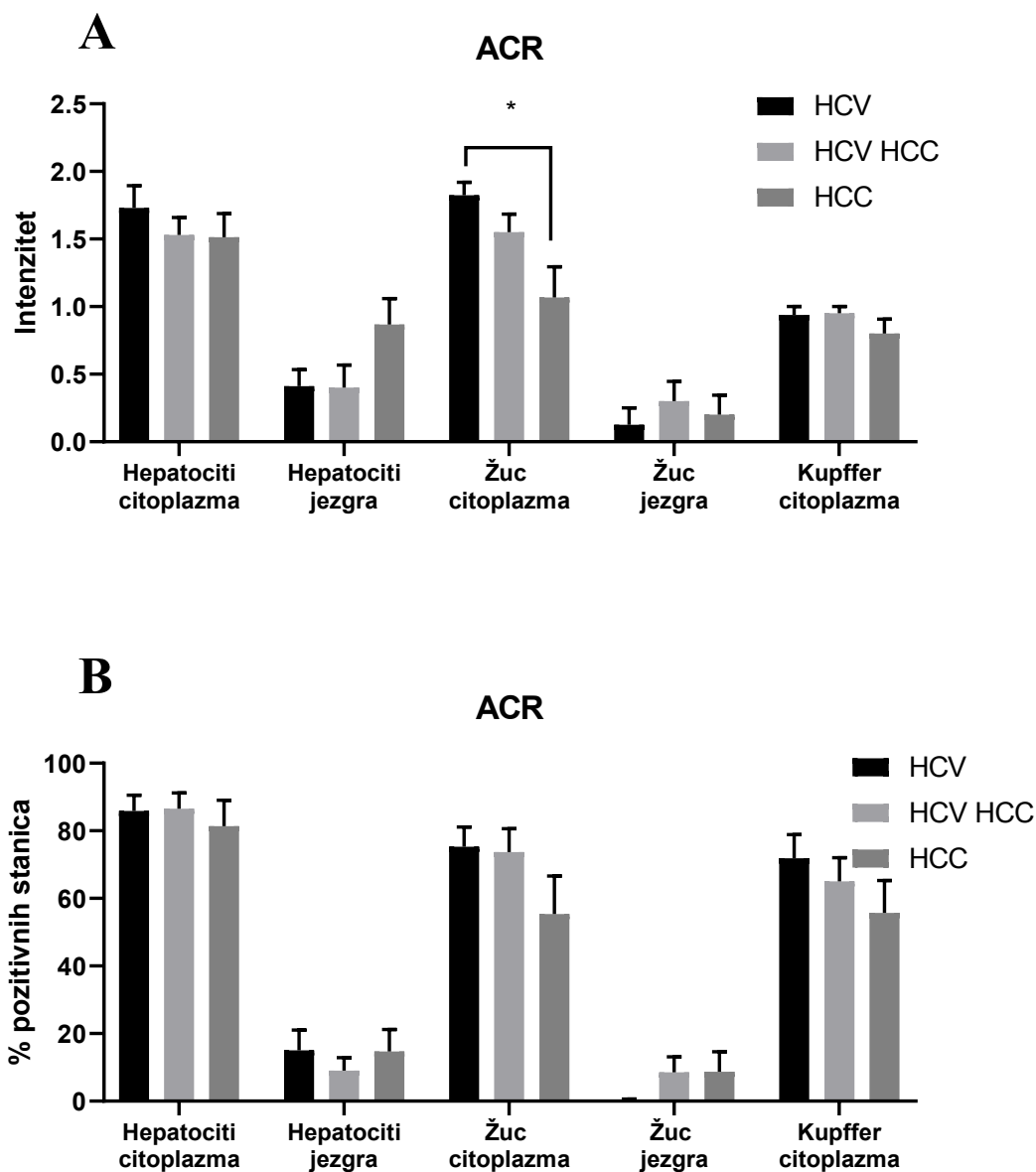
Slika 12. Imunohistokemijsko bojanje na akrolein proteinske konjugate, reprezentativna slika (100x). Smeđe obojenje prikazuje prisutnost akroleina.





Slika 13. Intenzitet (A) i postotak (B) ACR pozitiviteta u jetri ispitanika s alkoholnom etiologijom. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

Kod HCV infekcije (Slika 14) intenziteti pozitiviteta na akrolein viši su u citoplazmi u odnosu na jezgru. Intenzitet pozitiviteta značajno je niži kod HCC-a u citoplazmama stanica žuči u odnosu na HCV ( $p = 0.017$ ). Postotak stanica pozitivnih na akrolein je, slično kao i kod HNE-a visok, s preko 60 % pozitivnih stanica žuči, hepatocita i Kupfferovih stanica. Također, kao i kod HNE-a, postotak pozitivnih jezgri je izrazito niski, dok kod Kupfferovih stanica nema pozitivnih jezgri.

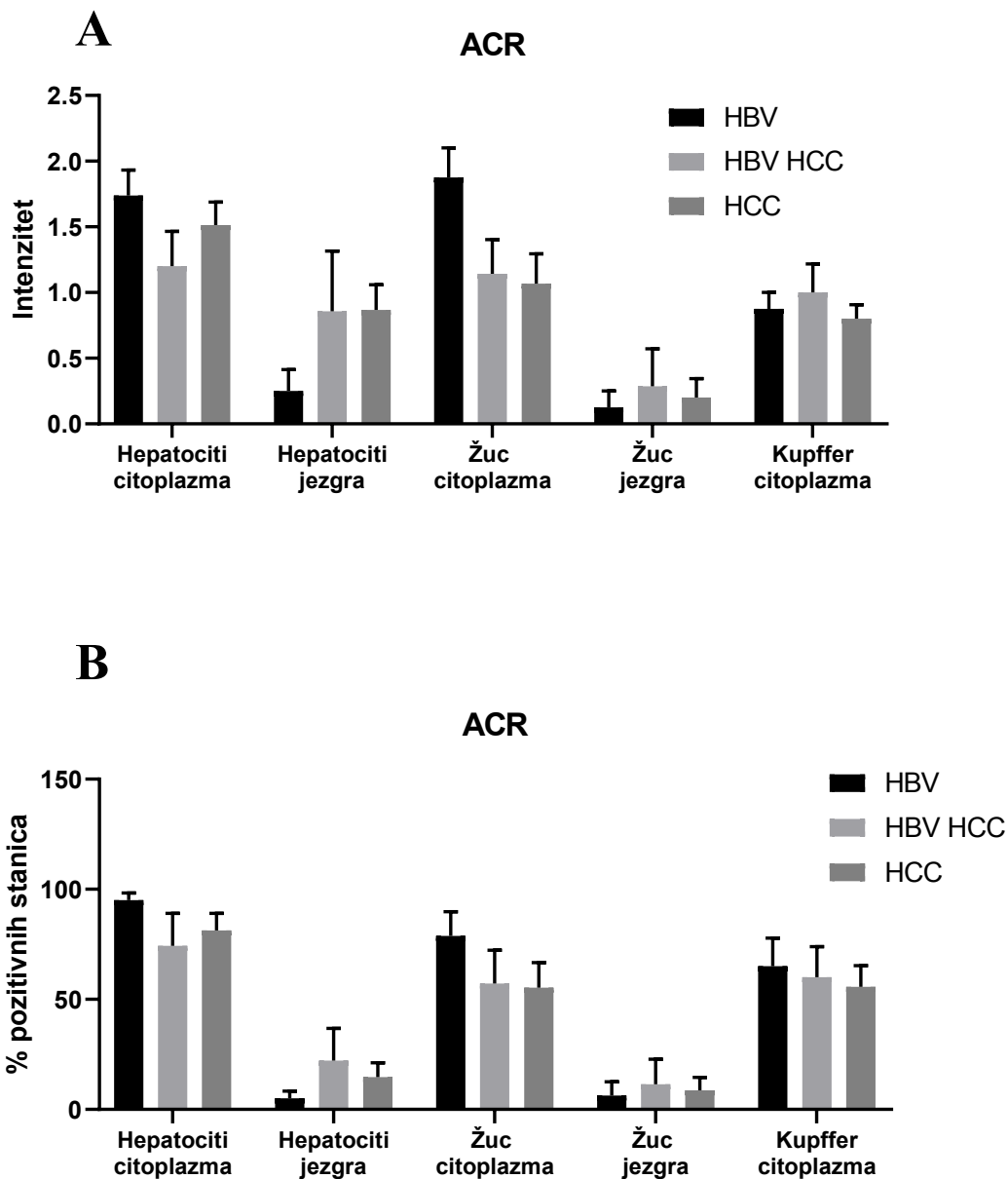


Slika 14. Intenzitet (A) i postotak (B) ACR pozitiviteta u jetri ispitanika s HCV infekcijom.

Prikazane su srednja vrijednost +/- SE; \*  $p < 0.05$

Intenziteti obojenja kod HBV infekcije jači su u citoplazmama nego u jezgrama hepatocita i stanica žuči, dok kod Kupfferovih stanica akrolein nije prisutan u jezgri. Iako se opaža isti trend kao i kod HCV infekcije u citoplazmama stanica žuči, tj. pad u HCC grupi u odnosu na HBV infekciju, ova razlika nije statistički značajna. Jedan od razloga može biti mali broj ispitanika u HBV grupi, budući da je mali broj ovih slučajeva. Gledajući postotke stanica

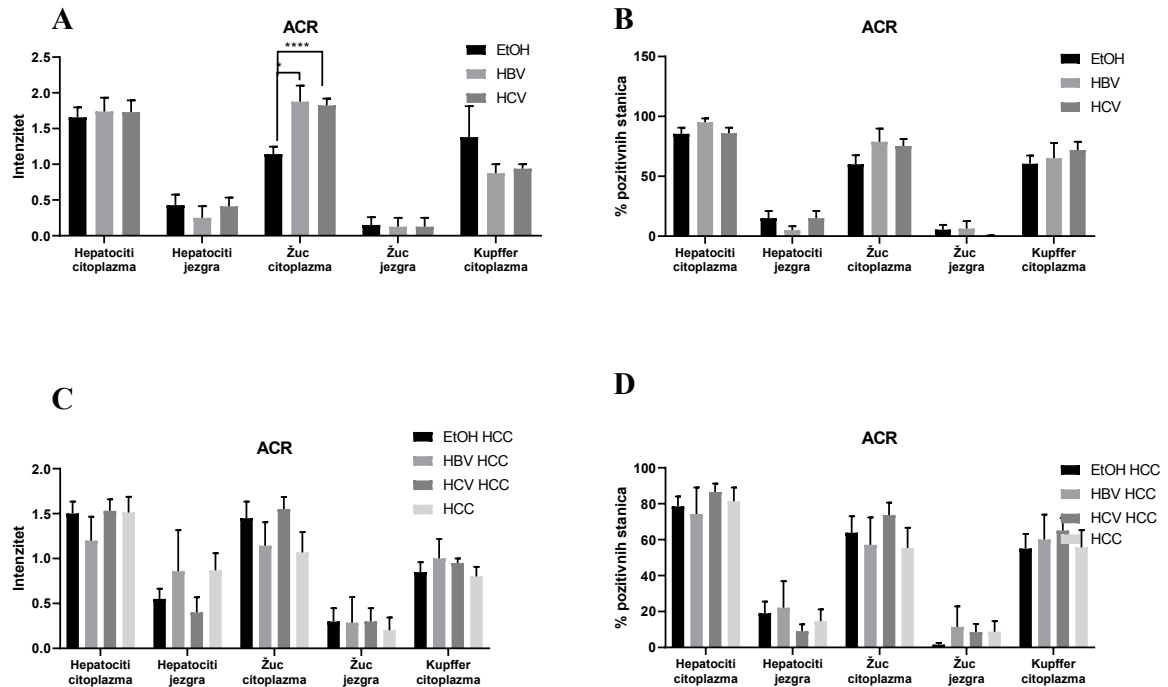
pozitivnih na akrolein, uočava se relativno visok postotak pozitivnih stanica, iznad 60%, s time da hepatociti pokazuju najveći postotak pozitivnih stanica.



Slika 15. Intenzitet (A) i postotak (B) ACR pozitiviteta u jetri ispitanika s HBV infekcijom. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

Usporedba grupa bez HCC-a pokazala je kako u citoplazmama stanica žuči dolazi od statistički značajnog povećanja akroleina u virusnim infekcijama u odnosu na alkoholnu etiologiju ( $p = 0.036$  za EtOH vs HBV odnosno  $p < 0.0001$  za EtOH vs HVC). Iako intenziteti pokazuju razliku, ove se grupe ne razlikuju po postocima pozitivnih citoplazmi i jezgri ni kod

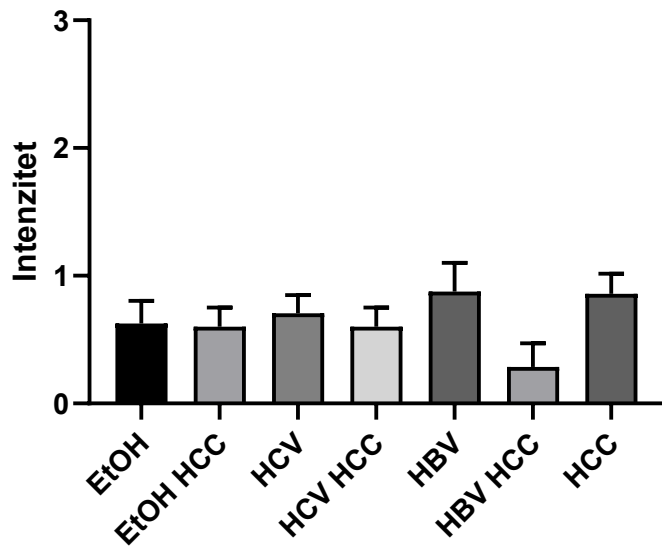
jednih tipova stanica jetre. Kod hepatocelularnog karcinoma nema razlike ni u intenzitetu ni u postotku pozitivnih stanica među različitim etiologijama.



Slika 16. Intenzitet (A) i postotak (B) ACR pozitiviteta u jetri se uspoređuju čimbenici rizika (EtOH, HBV, HCV) s nastalim HCC-om (EtOH HCC, HBV HCC, HCV HCC, HCC). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Usporedba intenziteta obojenja stanica strome na akrolein, pokazala je da se stroma boji niskim intenzitetom te da nema razlika među različitim grupama. Iako HCC razvijen uz HBV infekciju pokazuje niži trend od ostalih grupa, ova razlika nije statistički značajna. Svakako, ovo bi se trebalo istražiti, no problem kod HBV grupa (i HBV i HBV HCC) je izrazito mali broj dostupnih uzoraka/pacijenta s ovom etiologijom.

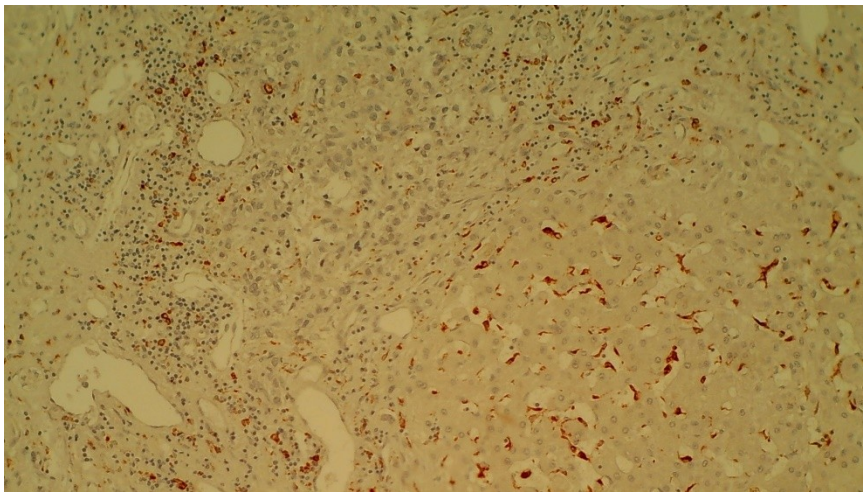
### ACR: Stroma



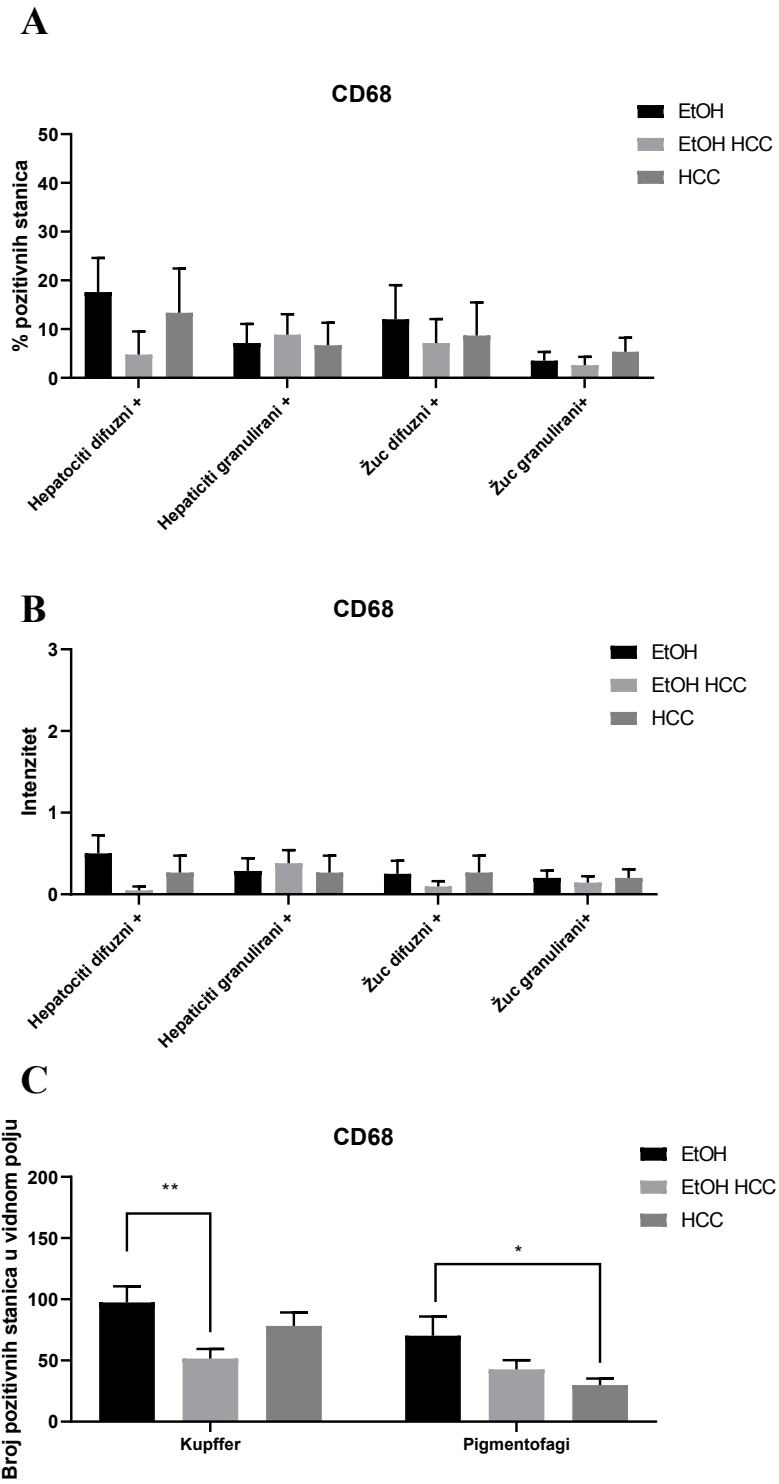
Slika 17. Intenzitet ACR pozitiviteta u stromi ispitanika čimbenika rizika i nastalog HCC-a. Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

#### 4.4. ANALIZA PRISUTNOSTI CD68

EtOH skupina najintenzivnije boja sve preparate osim granuliranih hepatocita, pozitivitet je prisutnost i intenzitet CD68 na stanicama jetre prikazana na slici 19. Intenziteti pozitiviteta su izrazito niski i bez statističke značajnosti među grupama. Bojanje na CD68 kod hepatocita i stanica žuči pokazalo je različit uzorak bojenja pa su kod ovih stanica razlučeni difuzni i granulirani pozitiviteti. Iako se kod CD68 primjećuje određeni trend bojenja kod grupa, taj trend nije statistički značajan. Značajne razlike uočene su kod Kupfferovih stanica gledajući broj pozitivnih stanica u vidnom polju, pri čemu se primjećuje značajan pad broja pozitivnih stanica u grupi EtOH HCC u odnosu na EtOH grupu ( $p=0.008$ ). Kod pigmentofaga je značajan pad pozitivnih pigmentofaga kod HCC grupe u odnosu na alkoholnu etiologiju ( $p=0.042$ ).

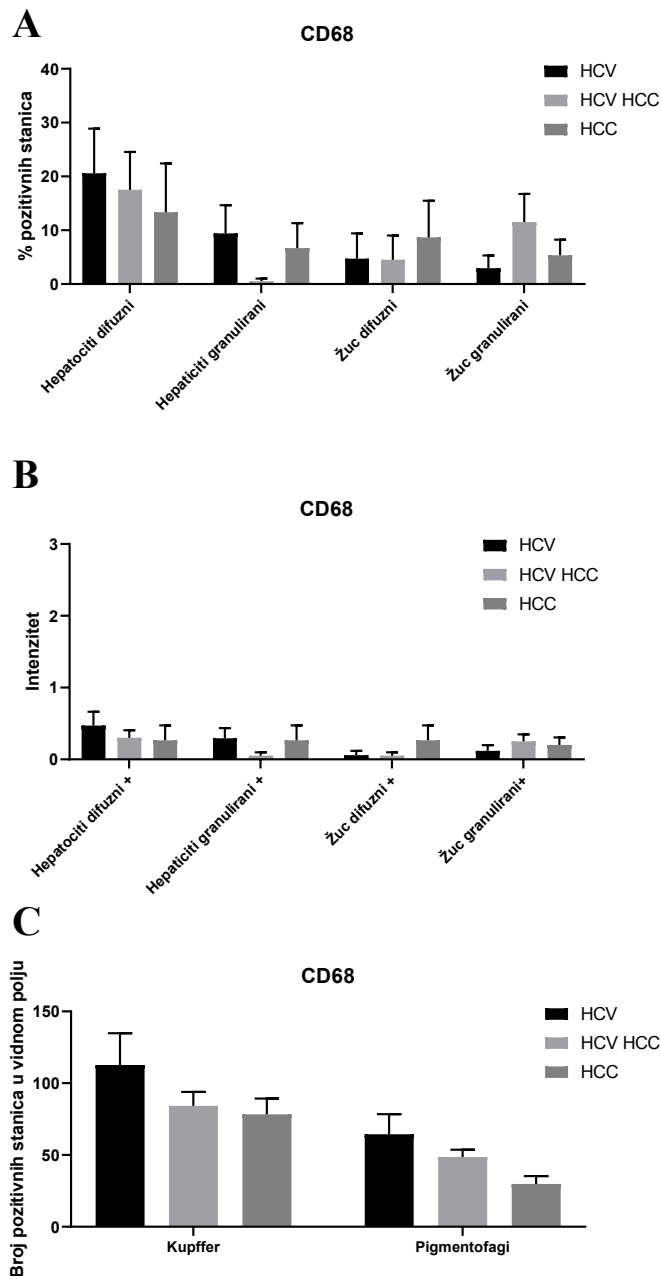


Slika 18. Imunohistokemijsko bojanje na CD68, reprezentativna slika (100x). Smeđe obojenje prikazuje prisutnost CD68.



Slika 19. Postotak (A) i intenzitet (B) CD68 pozitiviteta u području žuči i hepatocita ispitanika s alkoholnom etiologijom (EtOH) te broj pozitivnih stanica u vidnom polju kod Kupfferovih stanica i pigmentofaga (C). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

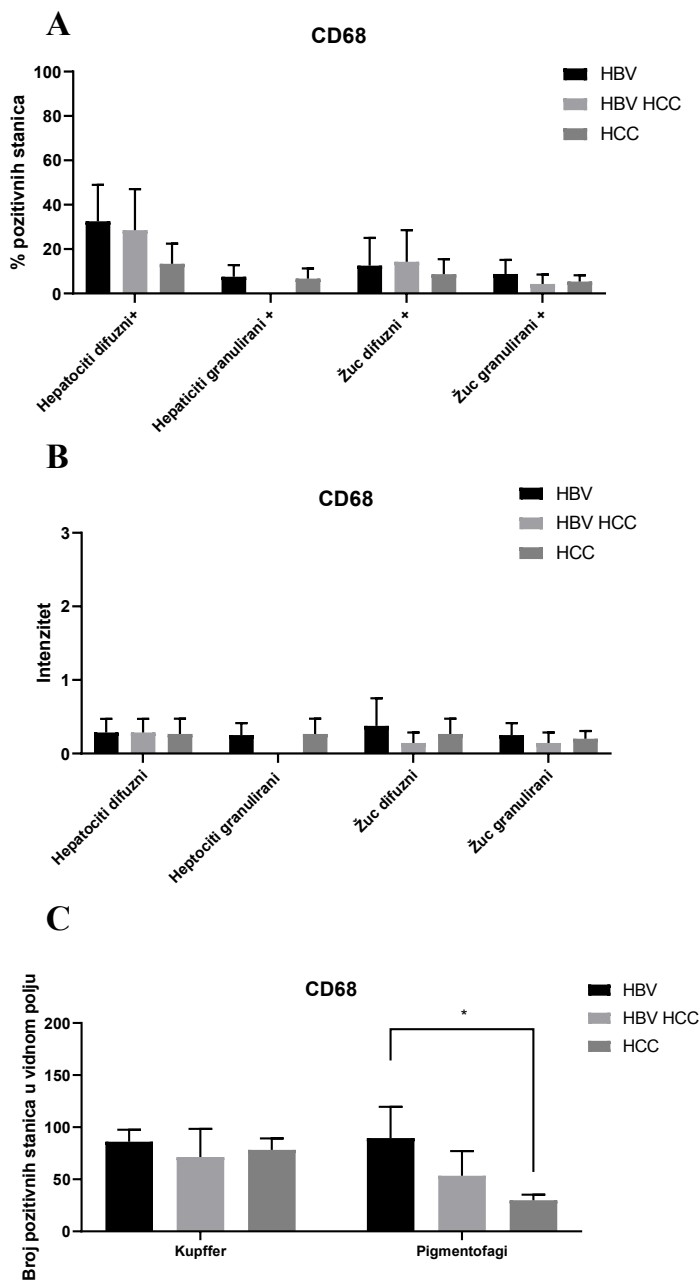
Pozitivitet na CD68 kod HCV infekcije prikazan je na slici 20. Kao i kod alkoholne etiologije, intenzitet CD68 pozitiviteta kod hepatocita i stanica žuči je izrazito niski i bez značajnih razlika. Također, postotak pozitivnih hepatocita i žuči je nizak, iako se kod hepatocita vidi trend pada pozitiviteta ukoliko se razvio HCC. Isti trend vidi se i kod Kupfferovih stanica i pigmentofaga, isto bez statističke razlike.



Slika 20. Postotak (A) i intenzitet (B) CD68 pozitiviteta u području žuči i hepatocita ispitanika s HCV infekcijom te broj pozitivnih stanica u vidnom polju kod Kupfferovih stanica i pigmentofaga (C). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE;  $p > 0.05$

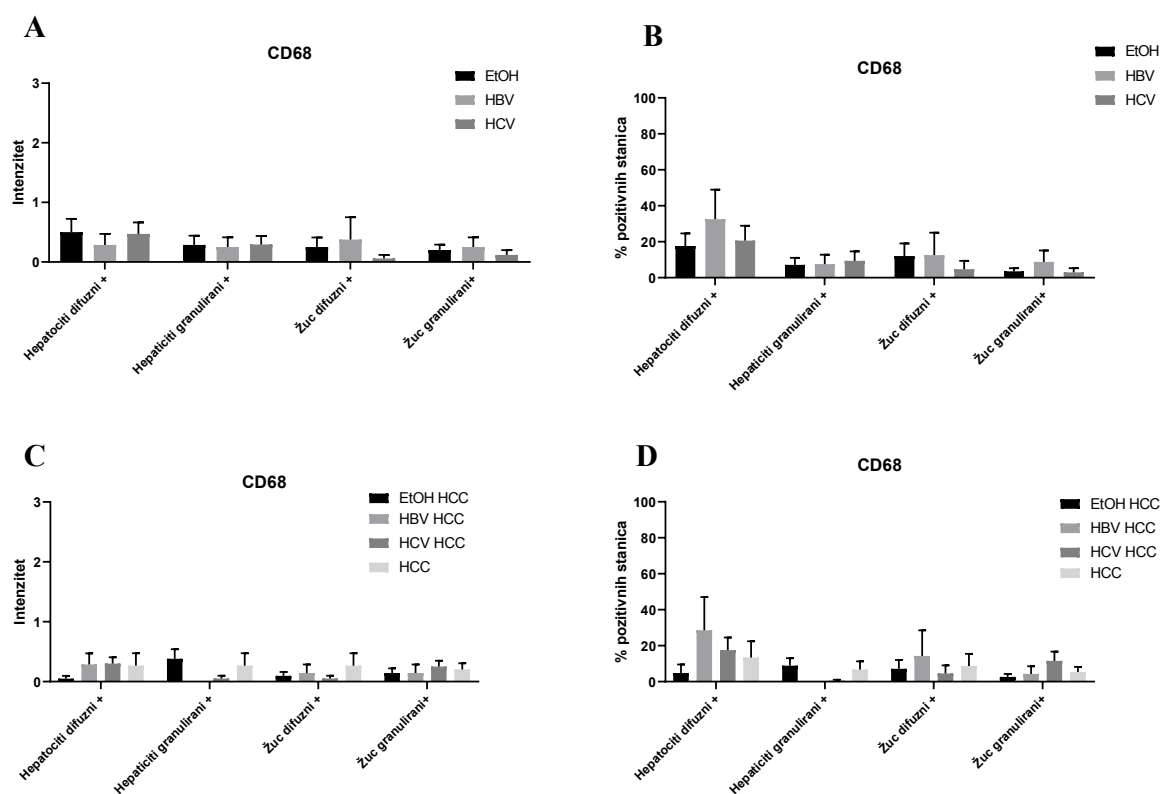


Pozitivitet na CD68 kod HBV infekcije prikazan je na slici 21. Kao i kod alkoholne etiologije, intenzitet CD68 pozitiviteta kod hepatocita i stanica žuči je izrazito niski i bez značajnih razlika. Također, postotak pozitivnih hepatocita i žuči je nizak, iako se kod hepatocita vidi trend pada pozitiviteta ukoliko se razvio HCC slično kao i kod HCV infekcije. Međutim, trend pada CD68 pozitiviteta kod HCC-a prisutan je kod pigmentofaga, ali ne i kod Kupfferovih stanica, te je statistički značajan kod čiste HBV infekcije u odnosu na HCC bez HBV infekcije ( $p=0.030$ ).



Slika 21. Postotak (A) i intenzitet (B) CD68 pozitiviteta u području žuči i hepatocita ispitanika s HBV infekcijom te broj pozitivnih stanica u vidnom polju kod Kupfferovih stanica i pigmentofaga (C). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE; \* p<0.05

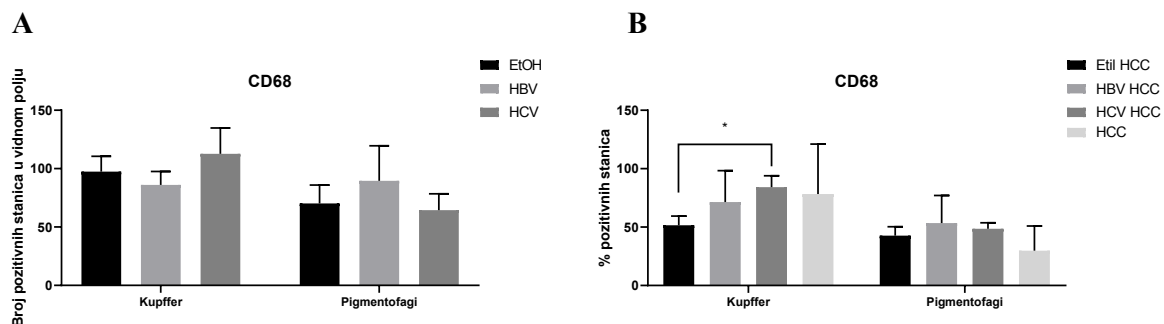
Kao i kod HNE-a i akroleina, uspoređene su grupe s i bez HCC (Slika 22). CD68 nije razlikovni čimbenik niti u jednoj skupini, uz niske intenzitete i postotke pozitivnih hepatocita i stanica žuči.



Slika 22. Intenzitet (A, C) i postotak (B, D) CD68 pozitiviteta u jetri ispitanika bez HCC-a (grupe EtOH, HBV, HCV) (A,B) i s nastalim HCC-om (grupe EtOH HCC, HBV HCC, HCV HCC, HCC) (C, D). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE; p>0.05

Usporedbom CD68 pozitiviteta u Kupfferovim stanicama i pigmentofagima u odnosu na prisutnost HCC-a (Slika 23), u grupama bez HCC-a nema statističke razlike u prisutnosti CD68 u Kupfferovim stanicama i pigmentofagima. Ukoliko je HCC prisutan, onaj s alkoholnom podlogom ima niži CD68 pozitivitet u Kupfferovim stanicama u odnosu na

virusne infekcije i na sami HCC, međutim, značajno se razlikuje s HCV HCC grupom ( $p=0.031$ ).



Slika 23. Broj CD68 pozitivnih stanica u vidnom polju u jetri ispitanika bez HCC-a (grupe EtOH, HBV, HCV) (A) i s nastalim HCC-om (grupe EtOH HCC, HBV HCC, HCV HCC, HCC) (B). Prikazane su srednja vrijednost +/- SE; \*  $p < 0.05$

## 5. RASPRAVA

Karcinogeneza i HCC postaju sve veći problem modernog svijeta obzirom da je zadnjih godina sve zastupljeniji u općoj populaciji. HCC nastaje najčešće kao posljedica ciroze jetre, međutim, etiologija ciroze jetre se mijenja, alkoholna predominacija prepustila je mjesto nealkoholnoj cirozi jetre, 59.46% slučajeva u 2017. godini, a 28.7% slučajeva uzrokovano je HBV infekcijom. Prevalencija NASH-a od 1990. do 2017. godine iznosi 115.61% [98]. U 1990. godini dekompenzacija jetre uzrokovana NASH-om potvrđena je kod 325 000 (302 000-349 000) bolesnika, a 2017. godine kod 917 000 (850 000-986 000) bolesnika (skoro trostruko povećanje) [99]. U 2012. godini je od HCC-a oboljelo 14 milijuna ljudi, očekuje se rast do 22 milijuna oboljelih u narednih 20 godina. Petogodišnje preživljenje HCC-a je <15% [100].

Iako alkoholna ciroza prepušta vodeće mjesto nealkoholnoj virozi, alkohol svakako ima jednu od ključnih uloga u nastanku ciroze jetre, uz činjenicu da značajno raste u zemljama u razvoju. Prevencija ima značajnu ulogu u incidenciji alkoholne ciroze jetre [101]. Cirozu jetre, mogu uzrokovati i infekcije hepatitisom B ili hepatitisom C, koje će u konačnici dovesti do razvoja HCC-a. Preventivnim mjerama, kao što je razvoj antivirusnih lijekova [102] ili cijepljenje protiv HBV infekcije, značajno se smanjuje udio bolesnika s razvijenom cirozom jetre, pa je tako u razdoblju od 1990. do 2020. godine prevenirano 310 milijuna HBV infekcija [103]. Ciljani antiviralni lijekovi učinkoviti su za sve genotipove HCV kod 90% zaraženih, čime se direktno doprinosi smanjenju incidencije ciroze jetre, međutim potrebna je snažna promocija liječenja te ga učiniti ekonomski dostupnim širokoj populaciji [104]. Nažalost često jetrena bolest u podlozi ograničava učinkovitost liječenja [60]. Stoga je od posebne važnosti rano otkrivanje HCC-a jer, kao i kod svih tumora, otkrivanje u ranom stadiju bolesti značajno poboljšava petogodišnje preživljenje bolesnika. Također, sustav zdravstva potiče sistemski probir i nadzor visokorizične ciljane populacije u svrhu rane detekcije HCC-a [61]. Kod HCC-a je sistemski nadzor visokorizičnih skupina prijeko potreban jer ima visoki stupanj mortaliteta, većinom iz razloga što je bolest dijagnosticirana u kasnom stadiju s omjerom incidencije/mortaliteta koji je približno 1. HCC čini oko 75-85% primarnih karcinoma jetre čime predstavlja globalni veliki zdravstveni problem. Iako je najveći broj slučajeva HCC-a u Istočnoj Aziji i Africi, incidencija je u značajnom porastu i u SAD i Europi. Praćenje visokorizične skupine bolesnika uključuje ultrazvučno praćenje, s ili

bez kontrole vrijednosti  $\alpha$ -fetoproteina svakih šest mjeseci, čime se značajno poboljšava rano otkrivanje i ukupno preživljenje; međutim, ograničenja u provođenju ovih sistematskih pregleda i dalje dovode do kasnog otkrivanja HCC-a u velikom broju slučajeva [58]□ . Kako što je već spomenuto, HCC ima u podlozi bolesti jetre (cirozu jetre, HBV ili HCV i NASH) postoje dodatni čimbenici koji doprinose razvoju karcinoma. Dakle, HCC se razvija kao posljedica kombinacije različitih uzroka, genetskih, imunoloških, virusnih infekcija, utjecaja okoliša i domaćina. Parametri domaćina su, prema literaturi, a i prema podacima naših ispitanika, muški spol, starost iznad 50 godina, obiteljska predispozicija, pretilost, uznapredovala ciroza jetre ili ciroza s koinfekcijom nekim drugim hepatotropnim virusom i HIV virusom. HIV virus nije bio utvrđen ni kod jednog od ispitanika našeg istraživanja. Utjecaj okoliša čine ovisnost o alkoholu, pušenje i izloženost aflatoksinu. Dodatno gledano, lošoj prognozi HCC-a doprinosi i činjenica da su oboljeli, često starije osobe, kritično bolesni sa pridruženim bolestima (srce, pluća), sa značajnim poremećajima hemostaze, bubrežne funkcije i elektrolita [62]□ .

Kao što je već rečeno, visok stupanj mortaliteta kod HCC-a je posljedica kasnog otkrivanja bolesti, odnosno HCC se otkiva u podmaklom stadiju bolesti, no djelomično i zbog neučinkovitog sistemskog liječenja HCC-a [65]□ . Stoga su tijekom liječenja HCC-a prisutna dva izazova, prvi je rano otkrivanje bolesti i drugi je liječenje, no prevladavanje oba je izrazito teško, stoga je obično HCC fatalan unatoč ranom postavljanju dijagnoze i otkrivanju bolesti.

Oksidacijski stres je svakako jedan od čimbenika koji doprinosi patogenezi HCC-a [18]. Na modelu štakora, koji zbog poremećenog transporta bakra spontano razvijaju žuticu, cirozu te na kraju i hepatocelularni karcinom, pokazano je kako je proizvod LPO, HNE, prisutan u različitim stadijima razvoja bolesti, te se pretpostavlja da igra ulogu u razvoju ove patologije.

Kako oksidacijski stres doprinosi širenju i razvoju oštećenja, brojni drugi čimbenici pridonose razvoju oksidacijskog stresa. Naime, jetreno oštećenje može biti akutni ili kronični upalni proces. U uvjetima lokalne upale aktiviraju se brojne jetrene stanice, kao što su sinusoidne endotelne stanice, stelatne stanice, dendritične stanice i Kupfferove stanice čime dolazi do otpuštanja brojnih medijatora upale, citokina i kemokina, koji dovode do nastanka oksidacijskog stresa [55]. Uzročnici upale u jetri mogu biti brojni, među njima su HBV i HCV infekcije, ovisnost o alkoholu i NASH [49]□ . Prema laboratorijskim podacima učinjenim na dan transplantacije 45.1% ispitanika je imalo opstruktivno oštećenje jetre

(vrijednost GGT >55 U/L, odnosno iznad gornje granice referentne vrijednosti), 69.2% je imalo parenhimsko oštećenje jetre (vrijednost AST > 38 U/L, odnosno iznad gornje granice referentne vrijednosti) te je povećanu vrijednost alfa fetoproteina (>5.8) imalo 32.7% ispitanika.

Uzevši u obzir ranije navedeno, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi pojavu oksidacijskog stresa uz druge uzroke nastanka HCC-a. Razina oksidacijskog stresa kod HCC-a istraživana je kroz uzroke karcinoma, HBV, HCV te alkoholnu etiologiju nastanka karcinoma. Kako se u mikrookolišu tumora, pa tako i HCC-a nalaze različite stanice s promijenjenom funkcijom (npr. fibroblasti, endotelne i upalne stanice, periciti), pretpostavka je da tumoru pridruženi makrofagi su čimbenici koji razlikuje infekciju i upalu u razvoju HCC-a. Također, i vanjski čimbenici će pridonijeti razvoju oksidacijskog stresa kod upale te će se prema tome dodatno razjasniti mehanizam nastanka HCC-a.

Prema godišnjim statističkim podacima Eurotransplanta koji su javni i prate se unatrag do 2011. godine, u Hrvatskoj 2011. godine je učinjeno 115 LTX, na listi čekanja za postupak LTX je bilo 77 bolesnika. Godine 2015. je učinjeno 139 LTX, na listi čekanja je bilo 62 bolesnika. 2020. godine se prati pad broja učinjenih LTX, učinjeno je 85 LTX, na listi čekanja za postupak LTX je bilo 112 bolesnika. Smanjeni broj učinjenih LTX 2020.godine je vjerojatno posljedica još uvijek prisutne epidemije SARS CoV-2 virusom.

Tumorsko tkivo građeno je od strome i parenhima. Stromu tumora čine stelatne stanice, makrofagi i endotelne stanice. Stroma ima ključnu ulogu kako u inicijaciji nastanka tumora, tako i u progresiji i metastaziranju tumora. Kronično upalno stanje jetre može izazvati smrt hepatocita ili njihovu kompenzatornu proliferaciju, s nakupljanjem oštećenja genoma. Upalna sredina potiče pojačano stvaranje krvnih žila, angiogenezu [105], doprinoseći samom metastaziranju tumora [106]. Te stanice proizvode nestanični dio strome, među kojima su i upalni citokini. Stroma tumorske stanice ima ulogu u rastu tumora, metastatskom širenju tumora i ishodu liječenja [107].

Budući da sistemsko liječenje ima slabu učinkovitost, što je većinom radi heterogenosti tumora, danas se sve veći naglasak stavlja na personalizirano liječenje tumora općenito, pa tako i HCC-a. Tumorske stanice rastu u cirotičnom mikrookolišu, u interakciji su sa stromalnim stanicama, koje, između ostalog, interferiraju i s djelovanjem lijekova [108]. Nastanak i progresija HCC-a posljedica su kronične upale, i različite etiologije, s posljedičnim kontinuiranim ciklusima destruktivno-regenerativnih radnji. HCC je solidni tumor za čiji

nastanak značajan utjecaj imaju okoliš, točnije virusne infekcije (HBV, HCV) i ovisnost o alkoholu što izaziva oksidacijski stres. Naš rad je pokazao kako HBV infekcija i HCV infekcija prerastaju u HCC pri čemu se smanjuje lokalno upalno stanje u tkivu jetre koje je vidljivo padom CD68 u pigmentofagima. Liječenje, odnosno konvencionalna kemoterapija je značajan izvor oksidacijskog stresa u stanicama HCC-a što izaziva apoptozu stanice ili autofagiju stanice [109]. Makrofagi imaju značajnu ulogu u patogenezi HCC-a te se pretpostavlja da bi dobro poznavanje uloge makrofaga u HCC-u, imalo značajan doprinos u učinkovitom liječenju HCC-a [110].

Moderan način života i nezdrave prehrambene navike su učinile nealkoholnu masnu bolest jetre (od engl. *Non-alcoholic fatty liver disease* – NAFLD) najzastupljenijim oboljenjem jetre širom svijeta, s globalnom prevalencijom ~ 25%. Iako se smatra da je NAFLD dobroćudno oboljenje, može napredovati do značajne fibroze jetre i HCC-a. Muški spol, starija životna dob i bijela rasa su čimbenici koji mogu ubrzati progresiju nastanka fibroze u NAFLD [111]. Raspodjela podataka prema spolu u ovome radu je muški spol 83.6% u odnosu na ženski 16.4%, što odgovara i svjetskim trendovima koji ubrzavaju i potiču fibrozu i nastanak ciroze jetre.

Osobe starije životne dobi (>65 godina starosti) sa zatajenjem jetre su visokorizični za postupak LTX, imaju slabiji postotak preživljenja koji proporcionalno raste s dobi u usporedbi s osobama starosti 60-65 godina. S druge strane, oni koji neposredno prežive postupak LTX, imaju potpuni ili djelomice limitiran funkcionalni oporavak. Paradoks je u tome što je imunološki sustav starijih osoba oslabljen, radi čega je tim osobama potrebna niža doza imunosupresivnih lijekova po LTX i rjeđi su slučajevi akutnog odbacivanja grafta. Međutim, dugoročno gledano, postotak preživljenja je nizak radi dugoročno nastalih komplikacija, kao što su maligna i srčana oboljenja [112]. Incidencija malignih oboljenja kod transplantiranih bolesnika je 10 do 15 puta veća u odnosu na zdravu populaciju [113]. Dob je proporcionalna s učestalošću nemelanomskih neoplazija kože, de novo zloćudnih oboljenja solidnih organa [114] te hematoloških zloćudnih novotvorevina kao što su limfomi [112]. Iz tog je razloga bitna pomna selekcija potencijalnih primatelja organa među starijim bolesnicima [115]. U razdoblju od 2002. do 2016. godine, linearno je narastao postotak bolesnika starije životne dobi (>65 godina starosti) kojima je učinjena LTX od 6.3% na 15.7% u Europi te od 6.8% na 18.6% u Americi. Statistički je značajan brži rast u Americi nego u Europi ( $p < 0.001$ ), odnosno brži je rast postotka starijih primatelja u Americi nego u Europi. Razlog tomu je spekulativan: jesu li kriteriji u Europi za postupak LTX kod starijih, često i

pretilih, osoba stroži, jesu li bolesnici s NASH premalo upućeni u transplantacijske centre na evaluacije, je li populacija u Americi velikim dijelom sa zastupljenim metaboličkim sindromima od ranije pod pomnim nadzorom ostaje za daljnja istraživanja [116].

Gledano prema dobnim skupinama prema pridobivenim podacima ispitanika ovoga rada, dominiraju stariji bolesnici, skupno čine 67.9% (>60 godina starosti (48.3%) i >70 godina (19.6%)), oni mlađi >50 godina starosti čine 26.1%. Svi bolesnici su bili bijele rase.

Unatoč smanjenoj incidenciji kroničnih infekcija jetre, prisutan je neočekivani porast incidencije HCC-a [117]. Bolesnici s HCV cirozom imaju 3.5 puta veći rizik od razvoja HCC-a u odnosu na bolesnike koji nemaju HCV infekciju. Isto tako, bolesnici koji imaju HBV cirozu jetre imaju 2 puta veći rizik od razvoja HCC u odnosu na one koji imaju cirozu jetre bez znane HBV infekcije [118].

NAFLD se prikazuje u različitim stupnjevima, od steatoze u odsutnosti pretjeranog uživanja alkohola do NASH sa ili bez ciroze jetre. Tri do 15% pretilih osoba sa znakovima NASH-a progredira do ciroze jetre i 4-27% NASH-a sa cirozom progredira do nastanka HCC-a. HCC također može nastati i “de novo” kod bolesnika s NASH-om bez prisutne ciroze. Godišnja kumulativna incidencija HCC-a nastalog kao posljedica NASH-a je niska (2.6%) u usporedbi sa 4% kod virusnog uzroka nastanka HCC-a. Čimbenici rizika za nastanak NAFLD-a su među ostalim metabolički sindrom, IR, promijenjena crijeva flora i stalno upalno stanje [73]. Metabolički sindrom objedinjuje 4 kardijalna rizična čimbenika: abdominalna pretilost, intolerancija glukoze/ ŠB tip 2, dislipidemija i AH [119].

NASH je upalno oboljenje jetre nastalo kao posljedica pretilosti. Rastom incidencije NASH-a u zemljama Zapada, raste i učestalost indikacija za LTX kao posljedica NASH-a. Istraživanjem je utvrđen recidiv HCC-a nakon učinjene LTX kod 19% bolesnika oboljelih od NASH-a u odnosu na 7.6% kod onih koji nisu imali NASH [120].

Prema podacima pridobivenim od naših ispitanika, u razdoblju od 2007. do 2015. godine, ukupno 22.8% bolesnika je u trenutku obrade za postupak LTX imalo utvrđenu ŠB tip 2. Od ukupnog broja ispitanika 42.8% ih je liječeno inzulinom, 28.5% ih je bilo na peroralnim antidijabetičima, a 28.5% ih nije liječeno, odnosno, oni su novootkriveni slučajevi ŠB u trenu dijagnostičke obrade. ŠB je jedan od glavnih rizičnih čimbenika za razvoj NASH-a. Veliki je broj istraživanja vezan uz povoljan utjecaj peroralne antidijabetičke liječenja metforminom na



smanjenje oksidacijskog stresa i kronično upalno stanje u jetri mijenjajući polarizaciju makrofaga i infiltraciju T limfocita [121] [122]. Prema podacima prikupljenim od naših ispitanika, samo su 3, odnosno 8.5% bolesnika bila liječeno metforminom u trenutku obrade za stavljanje na listu za LTX. Inzulin je značajan u liječenju onih bolesnika sa ŠB tip 2 kod kojih nije moguće regulirati glikemiju peroralnim lijekovima ili kod kojih je radi pridruženih bolesti primjena peroralnih antidijabetika kontraindicirana. Sami učinak inzulina na NAFLD je i dalje predmet brojnih istraživanja. U jednoj od studija utvrđena je 76% prisutnost steatoze jetre kod bolesnika koji nisu liječeni inzulinom, u odnosu na 62% kod onih koji su bili liječeni inzulinom. Mehanizam djelovanja je supresijom slobodnih masnih kiselina (od engl. *Free Fatty Acid* – FFA) i unosom glukoze u jetru kod bolesnika sa ŠB tip 2 i NAFLD [123].

Disfunkcionalno masno tkivo i IR imaju ključnu ulogu u nastanku NASH. Novija istraživanja ukazuju na veću učestalost bolesnika sa NASH-om sa značajnom IR i lipotoksičnosti u usporedbi s pretilim bolesnicima kod kojih je prisutna izolirana steatoza jetre [124].

Utvrđeno je nekoliko puteva kojim nastaje oštećenje jetre kod bolesnika sa ŠB. Kompenzatorna hiperinzulinemija je dominirajući rizični čimbenik za nastanak oksidacijskog stresa u jetri, posljedičnu jetrenu ozljedu i upalnu reakciju. ŠB bolest dovodi do prekomjernog nakupljanja masti u jetri uzrokujući nastanak masne jetre i NAFLD. Kod 2-3% bolesnika s NAFLD je prisutno upalno stanje jetre, nekroza i fibroza, odnosno NASH. Tako oštećena jetra razvija cirozu, HCC i zatajenje [125].

Novije meta analize provedene na 8 500 000 ispitanika u 22 zemlje pokazale su da je 80% bolesnika s prisutnom NAFLD bilo pretilo, 72% ih je imalo dislipidemiju i 44% ŠB tip 2 [126].

Čimbenici rizika kao što su pretilost, AH, hiperlipidemija, kronična bubrežna bolest (KBB) i pušenje povećavaju rizik od nastanka progresije i razvoja ciroze kod bolesnika sa NASH-om [127].

Brojne su studije objavljene o toksičnom učinku visokih vrijednosti kolesterola u jetri. Nakupljanje slobodnog kolesterola, ne triglicerida ili masnih kiselina, čini hepatocite osjetljivijima za nastanak apoptoze radi nedostatka antioksidansa GSH u mitohondrijim [128]. Nakupljanje slobodnog kolesterola u obliku kristala također može oštetiti hepatocite i potaknuti upalni odgovor uz pomoć Kupfferovih stanica [129], jednako kao što se može nakupljati i u samim Kupfferovim stanicama i izazivati upalni odgovor [130].

Analizom podataka dobivenih iz medicinske dokumentacije naših ispitanika, hiperkolesterolemija (vrijednost kolesterola  $>5$ ) uočena je u preoperativnoj evaluaciji kod 11.1% ispitanika, dok se u posttransplantacijskoj kontroli uočava porast na 33.9%.

Indeks ateroskleroze je matematični logaritamski izračun odnosa triglicerida/ HDL kolesterola. Vrijednost od 0.1 do 0.24 nosi srednji kardijalni rizik, odnosno  $>0.24$  s visokim kardijalnim rizikom [131]. Analizom prikupljenih podataka za našu studiju, srednje visoka vrijednost indeksa ateroskleroze je bila prisutna kod 8.5% ispitanika, a visoka kod 9.8% ispitanika. Isti parametri su uspoređivani i analizirani 1 mjesec po učinjenom postupku LTX gdje se prati porast srednje visokog rizika indeksa ateroskleroze kod 12.4% ispitanika dok je visoka vrijednost indeksa ateroskleroza ostala ista kod 9.8% ispitanika. Indeks ateroskleroze je proporcionalan sa NAFLD-om radi čega se može koristiti kao jedan od „probirnih“ indikatora za NAFLD kod osoba koje nisu pretile [132].

Epidemiološke studije ukazuju na povezanost NAFLD i esencijalne hipertenzije (*Esencijalna hipertenzija*) predstavlja povišeni krvni tlak za koji se ne zna razlog nastanka), koja je prisutna kod otprilike 50% bolesnika sa NAFLD [133]. Nadalje, prevalencija (*Prevalencija* je broj svih slučajeva pojedinih bolesti kod određenog stanovništva u određenom periodu ) steatoze jetre je češća kod hipertenzivnih bolesnika bez ŠB (31%) u usporedbi s normotenzivnim bolesnicima (13%). Povišeni krvni tlak je povezan uz nastanak težih oblika NAFLD-a [134].

Pri cirozi jetre prisutan je značajan hemodinamski poremećaj, hiperdinamska cirkulacija i smanjeni efektivni volumen krvi. Iz tog su razloga bolesnici sa cirozom jetre češće hipotenzivni ili normotenzivni. Portalna hipertenzija i povećani splahnični krvotok su većinom odgovorni za nastanak hiperdinamične cirkulacije i posljedične promjene kardiovaskularnog sustava s nastankom cirotične kardiomiopatije, autonomne i bubrežne disfunkcije [135]. Međutim, povišeni krvni tlak prisutan je kod određenog broja bolesnika, pa je prema literaturi prevalencija AH kod tih bolesnika 3% do 10% [136].

Globalna prevalencija AH procijenjena je na 1.3 bilijuna u 2015.godinu, gdje je prevalencija od 150 milijuna slučajeva u Centralnoj i Istočnoj Europi, kod odraslih osoba je prevalencija oko 45%, učestalost se povećava s dobi, sjedećim načinom života i povećanjem tjelesne težine [137]. AH je prema podacima ispitanika za našu studiju preoperativno pri evaluaciji za stavljanje na listu za postupak LTX imalo 23.5% ispitanika.

Upalno promijenjeni mikrookoliš u NAFLD-u, uz IR, dislipidemiju, OS, AH i aktivirani renin-angiotenzin sustav mogu ubrzati nastanak i progresiju KBB-a. Usporedno gledano, rizik od nastanka KBB i potrebe za simultanom transplantacijom jetre i bubrega je veći kod bolesnika sa NASH uzrokovanom cirozom jetre [138]. Nadalje, KBB može pogoršati NAFLD preko uremičnih toksina, translokacije crijevnih bakterija i poremećaja u metabolizmu glukokortikoida [139]. Zanimljivi je podatak da promjene životnih navika kod bolesnika s NASH-om, znatno poboljšavaju histologiju jetre i posljedično bubrežnu funkciju [140]. KBB je bila prisutna kod 5.8% ispitanika.

NAFLD je globalno postao jedan od najčešćih oblika kronične jetrene bolesti, njegova je prevalencija u porastu, a posljedica je metaboličkog sindroma koji objedinjuje pretilost, IR, AH te aterogenu dislipidemiju koja može uzrokovati nastanak cerebrovaskularnog infarkta i ŠB [141]. Veza između ŠB tipa 2, AH i CAD je kompleksnija no što se prije mislilo. Naime, NAFLD ima utjecaj na nastanak ŠB tip 2, AH i CAD [142].

Blizu 20% Amerikanaca ima NAFLD bez prisutne ŠB. Međutim, 33 do 66% bolesnika sa ŠB tipa 2 ima NAFLD. Čimbenici rizika su pretilost, dob, spol, dislipidemija, metabolični sindrom i sindrom policističnih jajnika [143]. ŠB povećava rizik od razvoja HCC-a za 80%, konzumacija alkohola preko 80 g/dan za 75%, konzumacija alkohola između 40 i 79 g/dan za 37% dok pušenje povećava rizik za 25%. Kod pojedinaca koji nemaju znakova jetrenog oštećenja, indeks tjelesne mase (od engl. *Body mass index* – BMI) je proporcionalno vezan uz nastanak HCC-a, za razliku od osoba sa znanim oštećenjem jetre gdje je ta vjerojatnost obrnuto proporcionalna. Gledano prema literaturi i dobnim skupinama, svakodnevna konzumacija alkohola 20g/dan povećava rizik od razvoja HCC-a za 6%, 8%, 16% i 30% u dobnim skupinama ispod 50 god, između 50 i 59 godina starosti, između 60 i 69 godina starosti te između 70 i 80 godina starosti. Žene imaju viši rizik vezan uz dob i prisutnu cirozu u odnosu na muškarce. S dobi, alkohol i HCV infekcija imaju značajan utjecaj na razvoj HCC-a, muški spol ima s dobi manji utjecaj. Pušenje povećava rizik od razvoja HCC-a neovisno o prisutnom virusnom hepatitisu dok ŠB povećava rizik od razvoja HCC-a neovisno od prisutne ciroze jetre [144].

Prati se značajna povezanost doze, vremena trajanja pušenja i rizika od nastanka HCC-a u odsutnosti ovisnosti od alkohola ili kroničnog virusnog hepatitisa. Pušači, u odsutnosti HBV/HCV infekcije, koji ne konzumiraju redovito alkohol, imaju 1.85 puta veći rizik od razvoja HCC-a [145]. Nismo u mogućnosti učiniti korelaciju tvrdnje s našim istraživanjem jer

prilikom izrade rada podatak o konzumaciji alkohola, bilo povremenoj ili redovitoj, nije praćen. Najveći dio duhana razgrađuje se jetri. Proizvodi tog metabolizma su karcinogeni [146].

Mortalitet HCC-a je proporcionalan ukupnim godinama pušenja i količini konzumiranog alkohola ( $p < 0.001$ ), uz napomenu da je prisutan aditivni učinak ukoliko su prisutne obje navike, omjer kod konzumacije alkohola većeg od 46.2 g/dan i više od 10 godina pušenja više od 1 kutije cigareta/dan iznosi 1.45 do 2.05. Prestanak bilo koje od te dvije navike je umanjio mortalitet od HCC-a, značajno je smanjeno nakon više 10 godina apstinencije. Kod bolesnika s virusno uzrokovanim nastankom HCC-a, pušenje i ovisnost o alkoholu imaju štetan utjecaj na HCC preživljenje. Prestanak pušenja i stroga apstinencija imaju povoljan utjecaj na tijek bolesti tek nakon dugog perioda apstinencije [147].

Zanimljivo je da u ovom radu konzumacija alkohola nije izazvala promjene u razini HNE-a u hepatocitima i u stanicama žuči, iako se vidi trend povećanja HNE-a od same alkoholne etiologije preko alkoholom izazvanog HCC-a do HCC-a bez poznatog uzroka.

Pušenje je također vezano uz nižu razinu NK (od engl. *Natural Killer* – NK) stanica u perifernoj krvi. Pušenje u kombinaciji sa smanjenom količinom NK stanica povećava opterećenje virusom [148]. Pušenje sinergistično djeluje s HCV infekcijom kod muškaraca te kod ovisnosti od alkohola kod žena [149]. Interakcija je najvjerojatnije biološka jer dim cigarete sadrži nekoliko promotagenih čimbenika jednako kao i potencijalnih inicijatora, kao što je alkohol putem ciroze. Utvrđeno je da je duhanski dim važan uzrok HCC-a kod bolesnika koji nemaju kroničnu HBV ili HCV infekciju. Obzirom da većina nastalih HCC slučajeva ne nastaje na podlozi HCV ili HBV infekcije, pušenje, odnosno duhanski dim i ovisnost o alkoholu smatraju se najodgovornijim za nastanak HCC-a [150]. Gledano za akrolein, koji može nastati kao posljedica LPO, ali i kao štetni proizvod u duhanskom dimu [151], kod alkoholne etiologije se ne mijenja značajno iako se uočavaju određeni trendovi. Kod infekcije HCV-om, u citoplazmama stanica žuči njegov je intenzitet najviši kod infekcije HCV-om, i pada ukoliko se razvio HCC te je značajno niži kod HCC-a bez poznate etiologije. Slične trendove kao kod HCV-a uočavamo i kod HBV infekcije, no bez statističke značajnosti, što se može objasniti malim brojem uzoraka. Ovi rezultati upućuju na mogućnost da HCC na neki način kompenzira LPO te smanjuje razinu ovog izuzetno toksičnog aldehida što dalje može voditi u rezistenciju, a ne liječenje. Gledano po etiologijama, statistički značajno niža razina akroleina nalazi se kod alkoholne etiologije u odnosu na obje virusne, što

može značiti da virusna infekcija pojačava LPO te je ona u podlozi virusnog oštećenja jetre. Među našim ispitanicima u predtransplantacijskoj evaluaciji je bilo 20.2% pušača. U stromi je intenzitet pozitiviteta na akrolein bio izrazito niski.

Ženski spol ima jače izražene genetske abnormalnosti, ALDH1A2 u karcinogenezi HCC-a u odnosu na muški spol [152]. Estrogeni imaju imunostimulacijski učinak, za razliku od androgena koji imaju immunosupresijski učinak. Međutim, spolni hormoni, kao što su androgeni, mogu direktno reagirati s HBV genomom ugrađenim u staničnu jezgu i aktivirati transkripciju HBV onkoproteina. S druge strane, receptori za estradiol i estrogen štite hepatocyte od upalnog oštećenja, apoptoze i OS, koji doprinosi stvaranju fibroze i maligne transformacije dovodeći do razvoja HCC-a. Sinergističko djelovanje muških i ženskih spolnih hormona i imunološkog odgovora, zajedno s utjecajem virusa doprinose nastanku spolnog nesklada u ishodu liječenja i progresiji virusne infekcije. Kod HCV ciroze jetre snižena ekspresija estrogenskog receptora alfa (ER $\alpha$ ) kod muških bolesnika bi mogla biti razlog slabijeg ishoda liječenja HCV infekcije kod muškaraca u odnosu na žene [153]. Kronični C hepatitis je vodeća indikacija za LTX u SAD [154]. Kako ALDH ima ulogu u detoksikaciji HNE-a, bilo je zanimljivo vidjeti kako se kreću razine HNE-a kod alkoholne i virusne etiologije kao i kod HCC-a s različitim podlogama nastanka. Za razliku od akroleina, HNE se nalazi u stromi, neovisno o etiologiji i s niskim intenzitetom. Konačno, iako se vide određeni trendovi, razlike u HNE-u nisu statistički značajne te ne ukazuju da bi HNE mogao imati značajnu ulogu u razvoju ovih patoloških stanja.

Kako je pokazano da HNE može regulirati imunološki odgovor [155], odabran je biljeg aktiviranih makrofaga CD68. U Kupfferovim stanicama se kod alkoholom izazvanog HCC-a smanjuje broj CD68 pozitivnih stanica u usporedbi s alkoholom oštećenom jetrom (EtOH grupa), dok se kod pigmentofaga pak vidi pad CD68 pozitivnih stanica kod HCC-a u usporedbi s jetrom oštećenom alkoholom (EtOH grupa). Iako se kod HCV infekcije vidi pad CD68 pozitivnih i Kupfferovih stanica i pigmentofaga od same HCV infekcije, preko HCV-om izazvanog HCC-a do HCC-a, ove razlike nisu statistički značajne. Međutim, kod HBV infekcije kod pigmentofaga uočavamo značajan pad CD68 pozitivnih stanica u odnosu na sami HCC. Čini se da se kod tumora regulira imunološki odgovor te se smanjuje aktivacija imunih stanica. Gledano kod svih grupa kod kojih se razvio HCC, najnižu razinu CD68 pozitivnih stanica ima s alkoholnom etiologijom u usporedbi s HCV uzrokovanim HCC.

Konačno, možemo zaključiti kako HCC utječe na imunološki odgovor jetre smanjujući ga i vjerojatno time izbjegavajući ga. LPO može imati ulogu u ovim postupcima, no HNE nije aldehid koji posreduje u interakcijama. Akrolein bi mogao imati ulogu u oštećenjima jetre kod virusnih infekcija, no potrebno je proširiti istraživanja kako bi jednoznačno mogli odrediti ulogu akroleina u virusnoj infekciji jetre.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Glavni mehanizam nastanka HCC-a je upalno stanje i oksidacijski stres. Na njegov nastanak utječu kronična infekcija s hepatitis B virusom (HBV) i hepatitis C virusom (HCV), toksini (alkohol i aflatoksin), metabolički utjecaj (ŠB, pretilost, AH, hiperkolesterolemija i NAFLD, nasljedna hemokromatoza) te imunološki posredovano (primarna bilijarna ciroza–PBC i autoimuni hepatitis).
2. Epidemiologija HCC-a se mijenja, povećava se broj slučajeva NASH u odnosu na broj oboljelih od hepatitisa.
3. Mehanizam nastanka HCC-a je značajno povezan uz vanjske čimbenike. Pušenje i muški spol su direktno proporcionalni s rizikom nastanka HCC-a iako nemaju utjecaj na ukupno preživljenje. Gledano na raspodjelu podataka prema spolu, u ovome radu je vidna predominacija muškog spola 83.6% u odnosu na ženski 16.4%, što odgovara i svjetskim trendovima koji ubrzavaju i potiču fibrozu i nastanak ciroze jetre. Gledano prema dobnim skupinama, prema pridobivenim podacima ispitanika ovoga rada, dominiraju stariji bolesnici, skupno čine 67.9% (>60 godina starosti (48.3%) i >70 godina (19.6%)), oni mlađi >50 godina starosti čine 26.1%. Prevalencija povišenog krvnog tlaka kod bolesnika sa zatajenjem jetre prema studijama iznosi 3% do 10%. Prema podacima naših ispitanika je bila viša, iznosi 23.5%.
4. Zanimljivo je da u ovom radu konzumacija alkohola nije izazvala promjene u razini HNE-a i akroleina u hepatocitima i u stanicama žuči, iako se vidi trend povećanja HNE-a od same alkoholne etiologije preko alkoholom izazvanog HCC-a do HCC-a bez poznatog uzroka. Međutim, sam alkohol ne izaziva oksidacijski stres i LPO u jetri.
5. Akrolein kao posljedica LPO i pušenja pružaju bolje razlikovne mogućnosti među grupama. Tako kod HCV infekcije akrolein pada ukoliko se razvije HCC kao posljedica HCV infekcije u stanicama žuči.
6. Akrolein je niži kod bolesnika s alkoholnom etiologijom u usporedbi s infekcijama i HCV i HBV.
7. Kad se razvije HCC, kao posljedica uzimanja alkohola, dolazi do smanjenja CD68 pozitivnih Kupfferovih stanica.

8. Kod pigmentofaga dolazi do pada CD68 pozitiviteta u jetrama zahvaćenim HCC-om u odnosu na alkoholnu etiologiju te infekciju HBV.
9. Promjene životnih navika kod bolesnika s NASH-om, znatno poboljšavaju histologiju jetre i posljedično bubrežnu funkciju. Prestanak pušenja i konzumacije alkohola imaju pozitivan učinak na karcinogenezu HCC nakon minimalno 10 godina apstinencije.
10. Rano postavljenje dijagnoze i liječenje HCC-a predstavlja izazov jer se bolest najčešće otkrije u stadiju sa već stvorenim presadnicama.



## 7. LITERATURA

1. Sies, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In *Oxidative stress*; Sies, H., Ed.; Academic Press: London, 1985; pp. 1–7.
2. Guéraud, F.; Atalay, M.; Bresgen, N.; Cipak, A.; Eckl, P.M.M.; Huc, L.; Jouanin, I.; Siems, W.; Uchida, K.; Gueraud, F.; et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1098–124.
3. Dodson, M.; Darley-usmar, V.; Zhang, J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *63*, 207–21.
4. Milkovic, L.; Cipak Gasparovic, A.; Cindric, M.; Mouthuy, P.A.; Zarkovic, N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells* 2019, *8*.
5. Milkovic, L.; Siems, W.; Siems, R.; Zarkovic, N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6529–42.
6. Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 2011, *15*.
7. Cichoz-Lach, H.; Michalak, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014, *20*.
8. Heppner, D.E.; van der Vliet, A. Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 24–7.
9. Liou, G.Y.; Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 2010, *44*, 479–496.
10. Klaunig, J.E.; Wang, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 116–121.
11. Radi, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*.

12. Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Čipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L.; Łuczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A.D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1216–62.
13. Barrera, G.; Gentile, F.; Pizzimenti, S.; Canuto, R.A.; Daga, M.; Arcaro, A.; Cetrangolo, G.P.; Lepore, A.; Ferretti, C.; Dianzani, C.; et al. Mitochondrial dysfunction in cancer and neurodegenerative diseases: Spotlight on fatty acid oxidation and lipoperoxidation products. *Antioxidants* **2016**, *5*.
14. Wang, Z.; Li, Z.; Ye, Y.; Xie, L.; Li, W. Oxidative Stress and Liver Cancer: Etiology and Therapeutic Targets. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–10.
15. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*; 1991; Vol. 11, pp. 81–128;.
16. Soto, M.E.; Guarner-Lans, V.; Herrera-Morales, K.Y.; Pérez-Torres, I. Participation of arachidonic acid metabolism in the aortic aneurysm formation in patients with Marfan syndrome. *Front. Physiol.* **2018**, *9*.
17. Li, S.; Zhao, X.; Wu, Z.; Li, Y.; Zhu, L.; Cui, B.; Dong, X.; Tian, S.; Hu, F.; Zhao, Y. Polymorphisms in arachidonic acid metabolism-related genes and the risk and prognosis of colorectal cancer. *Fam. Cancer* **2013**, *12*.
18. Marquez-Quiñones, A.; Cipak, A.; Zarkovic, K.; Fattel-Fazenda, S.; Villa-Treviño, S.; Waeg, G.; Zarkovic, N.; Guéraud, F. HNE-protein adducts formation in different pre-carcinogenic stages of hepatitis in LEC rats. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 119–127.
19. HZJZ, Registar za rak Croatian National Cancer Registry INCIDENCIJA RAKA U HRVATSKOJ. *Bilten* **2018**, *34*.
20. Barrera, G.; Pizzimenti, S.; Dianzani, M.U. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Mol. Aspects Med.* **2008**, *29*, 1–8.
21. Arauz, J.; Ramos-Tovar, E.; Muriel, P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann. Hepatol.* **2016**, *15*, 160–173.
22. Zarkovic, N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 281–291.

23. Lovell, M.A.; Xie, C.; Markesbery, W.R. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol. Aging* **2001**, *22*.
24. Gasparovic, A.C.; Milkovic, L.; Sunjic, S.B.; Zarkovic, N. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 226–234.
25. Milkovic, L.; Cipak Gasparovic, A.; Zarkovic, N.; Gasparovic, A.C.; Zarkovic, N.; Cipak Gasparovic, A.; Zarkovic, N. Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radic. Res.* **2015**, *49*, 850–60.
26. Esterbauer, H.; Muskiet, F.; Horrobin, D.F. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 779S-785S; discussion 785S-786S.
27. Pizzimenti, S.; Ciamporcero, E.; Daga, M.; Pettazzoni, P.; Arcaro, A.; Cetrangolo, G.; Minelli, R.; Dianzani, C.; Lepore, A.; Gentile, F.; et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front. Physiol.* 2013, *4 SEP*.
28. Li, D.; Gu, Z.; Zhang, J.; Ma, S. Protective effect of inducible aldo-keto reductases on 4-hydroxynonenal- induced hepatotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *304*.
29. Yang, T.; Sun, Y.; Mao, L.; Zhang, M.; Li, Q.; Zhang, L.; Shi, Y.; Leak, R.K.; Chen, J.; Zhang, F. Brain ischemic preconditioning protects against ischemic injury and preserves the blood-brain barrier via oxidative signaling and Nrf2 activation. *Redox Biol.* **2018**, *17*, 323–337.
30. Chen, Z.-H.; Saito, Y.; Yoshida, Y.; Sekine, A.; Noguchi, N.; Niki, E. 4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 41921–7.
31. Kreuzer, T.; Grube, R.; Wutte, A.; Zarkovic, N.; Schaur, R.J.; Proliferation, T.H.E.; Hela, O.F.; Cells, C. 4-Hydroxynonenal modifies the effects of serum growth factors on the expression of the c-fos proto-oncogene and the proliferation of HeLa carcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 42–9.
32. Milkovic, L.; Zarkovic, N.; Saso, L. Controversy about pharmacological modulation of

- Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 727–732.
33. Chiarpotto, E.; Castello, L.; Leonarduzzi, G.; Biasi, F.; Poli, G. Role of 4-hydroxy-2,3-nonenal in the pathogenesis of fibrosis. *BioFactors* **2005**, *24*.
  34. Dubinina, E.E.; Dadali, V.A. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions. *Biochem.* **2010**, *75*, 1069–1087.
  35. H., J.; M.R., M.; A., R. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* **2012**, *44*.
  36. Sommerburg, O.; Grune, T.; Ehrich, J.H.; Siems, W.G. Adaptation of glutathion-peroxidase activity to oxidative stress occurs in children but not in adult patients with end-stage renal failure undergoing hemodialysis. *Clin. Nephrol.* **2002**, *58 Suppl 1*.
  37. Shireman, L.M.; Kripps, K. a; Balogh, L.M.; Conner, K.P.; Whittington, D.; Atkins, W.M. Glutathione transferase A4-4 resists adduction by 4-hydroxynonenal. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *504*, 182–9.
  38. Malone, P.E.; Hernandez, M.R. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp. Eye Res.* **2007**, *84*, 444–54.
  39. Chapple, S.J.; Cheng, X.; Mann, G.E. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 319–31.
  40. Awasthi, S.; Singhal, S.S.; Awasthi, Y.C.; Martin, B.; Woo, J.-H.; Cunningham, C.C.; Frankel, A.E. RLIP76 and Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4372–7.
  41. Awasthi, Y.C.; Sharma, R.; Cheng, J.Z.; Yang, Y.; Sharma, A.; Singhal, S.S.; Awasthi, S. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 219–230.
  42. Singh, S.; Brocker, C.; Koppaka, V.; Chen, Y.; Jackson, B.C.; Matsumoto, A.; Thompson, D.C.; Vasiliou, V. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *56*, 89–101.

43. Hartley, D.P.; Petersen, D.R. Co-Metabolism of Ethanol, Ethanol-Derived Acetaldehyde, and 4-Hydroxynonenal in Isolated Rat Hepatocytes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1997**, *21*, 298–304.
44. Mohammad, M.K.; Avila, D.; Zhang, J.; Barve, S.; Arteel, G.; McClain, C.; Joshi-Barve, S. Acrolein cytotoxicity in hepatocytes involves endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *265*.
45. Zarkovic, N.; Cipak, A.; Jaganjac, M.; Borovic, S.; Zarkovic, K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J. Proteomics* **2013**, *92*, 239–47.
46. Bekyarova, G.; Tzaneva, M.; Bratoeva, K.; Ivanova, I.; Kotzev, A.; Hristova, M.; Krastev, D.; Kindekov, I.; Mileva, M. 4-Hydroxynonenal (HNE) and hepatic injury related to chronic oxidative stress. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2019**, *33*, 1544–1552.
47. Chen, J.; Deng, X.; Liu, Y.; Tan, Q.; Huang, G.; Che, Q.; Guo, J.; Su, Z. Kupffer Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Friend or Foe? *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 2367–2378.
48. Nguyen-Lefebvre, A.T.; Horuzsko, A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J. Enzymol. Metab.* **2015**, *1*.
49. Marquardt, J.U.; Edlich, F. Predisposition to Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma: From Mechanistic Insights to Therapeutic Strategies. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1421.
50. Simões, I.C.M.; Fontes, A.; Pinton, P.; Zischka, H.; Wieckowski, M.R. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *95*.
51. Fu, Y.; Chung, F.-L. Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. *Hepatoma Res.* **2018**, *4*, 39.
52. Pandyarajan, V.; Govalan, R.; Yang, J.D. Risk factors and biomarkers for chronic hepatitis b associated hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*.
53. Matsushita, H.; Takaki, A. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *BMJ Open Gastroenterol.* **2019**, *6*.

54. Tsuruta, H.; Sonohara, Y.; Tohashi, K.; Aoki Shioi, N.; Iwai, S.; Kuraoka, I. Effects of acetaldehyde-induced DNA lesions on DNA metabolism. *Genes Environ.* **2020**, *42*.
55. Ceni, E.; Mello, T.; Galli, A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 17756–17772.
56. Teschke, R. Hepatocellular carcinoma in alcoholic liver disease: mechanistic considerations and clinical facts. *Hepatoma Res.* **2019**, *2019*.
57. Huang, X.H.; Sun, L.H.; Lu, D.D.; Sun, Y.; Ma, L.J.; Zhang, X.R.; Huang, J.; Yu, L. Codon 249 mutation in exon 7 of p53 gene in plasma DNA: Maybe a new early diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in Qidong risk area, China. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*.
58. Singal, A.G.; Lampertico, P.; Nahon, P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J. Hepatol.* **2020**, *72*, 250–261.
59. Tang, A.; Hallouch, O.; Chernyak, V.; Kamaya, A.; Sirlin, C.B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdom. Radiol.* **2018**, *43*, 13–25.
60. Villanueva, A. Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1450–1462.
61. Horvat, N.; Monti, S.; Oliveira, B.C.; Rocha, C.C.T.; Giancipoli, R.G.; Mannelli, L. State of the art in magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma. *Radiol. Oncol.* **2018**, *52*, 353–364.
62. Puoti, C. New insights on hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects. *Hepatoma Res.* **2018**, *4*, 57.
63. Saviano, A.; Baumert, T.F. Mortality from liver cirrhosis and HCC in the DAA era: success in viral control is darkened by raise of metabolic disease. *HepatoBiliary Surg. Nutr.* **2019**, *8*.
64. Dasgupta, P.; Henshaw, C.; Youlden, D.R.; Clark, P.J.; Aitken, J.F.; Baade, P.D. Global Trends in Incidence Rates of Primary Adult Liver Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*.

65. Likhitsup, A.; Razumilava, N.; Parikh, N.D. Treatment for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Current Standard and the Future. *Clin. Liver Dis.* **2019**, *13*, 13–19.
66. Kinoshita, A.; Onoda, H.; Fushiya, N.; Koike, K.; Nishino, H.; Tajiri, H. Staging systems for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives. *World J. Hepatol.* **2015**, *7*.
67. Kew, M.C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma - PubMed. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2013**, *3*, 305–310.
68. Simon, T.G.; King, L.Y.; Chong, D.Q.; Nguyen, L.H.; Ma, Y.; VoPham, T.; Giovannucci, E.L.; Fuchs, C.S.; Meyerhardt, J.A.; Corey, K.E.; et al. Diabetes, metabolic comorbidities, and risk of hepatocellular carcinoma: Results from two prospective cohort studies. *Hepatology* **2018**, *67*, 1797–1806.
69. Védie, A.L.; Neuzillet, C.; Nault, J.C.; Paradis, V. Insulinorésistance et carcinome hépatocellulaire. *Hepato-Gastro Oncol. Dig.* **2017**, *24*, 579–585.
70. Wong, V.W.-S.; Chitturi, S.; Wong, G.L.-H.; Yu, J.; Chan, H.L.-Y.; Farrell, G.C. Pathogenesis and novel treatment options for non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *1*, 56–67.
71. Tan, Y.; Wei, S.; Zhang, W.; Yang, J.; Yang, J.; Yan, L. Type 2 diabetes mellitus increases the risk of hepatocellular carcinoma in subjects with chronic hepatitis B virus infection: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *Volume 11*, 705–713.
72. Seyda Seydel, G.; Kucukoglu, O.; Altinbas, A.; Oguz Demir, O.; Yilmaz, S.; Akkiz, H.; Otan, E.; Sowa, J.P.; Canbay, A. Economic growth leads to increase of obesity and associated hepatocellular carcinoma in developing countries. *Ann. Hepatol.* **2016**, *15*, 662–672.
73. Paul, S.; Dhamija, E.; Kedia, S. Non-alcoholic fatty liver disease associated with hepatocellular carcinoma: An increasing concern. *Indian J. Med. Res.* **2019**, *149*, 9.
74. Younossi, Z.M.; Marchesini, G.; Pinto-Cortez, H.; Petta, S. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for

- Liver Transplantation. *Transplantation* **2019**, *103*, 22–27.
75. Tsochatzis, E.; Coilly, A.; Nadalin, S.; Levistky, J.; Tokat, Y.; Ghobrial, M.; Klinck, J.; Berenguer, M. International Liver Transplantation Consensus Statement on End-stage Liver Disease Due to Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Transplantation. *Transplantation* **2019**, *103*, 45–56.
76. Mikolasevic, I.; Filipec-Kanizaj, T.; Mijic, M.; Jakopcic, I.; Milic, S.; Hrstic, I.; Sobocan, N.; Stimac, D.; Burra, P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation - Where do we stand? *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 1491–1506.
77. Dharmalingam, M.; Yamasandhi, Pg. Nonalcoholic fatty liver disease and Type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2018**, *22*, 421.
78. Fujii, H.; Kawada, N. The Role of Insulin Resistance and Diabetes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3863.
79. Perumpail, B.J.; Khan, M.A.; Yoo, E.R.; Cholankeril, G.; Kim, D.; Ahmed, A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 8263–8276.
80. Estes, C.; Razavi, H.; Loomba, R.; Younossi, Z.; Sanyal, A.J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* **2017**, *67*, 123–133.
81. Godoy-Matos, A.F.; Silva Júnior, W.S.; Valerio, C.M. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2020**, *12*.
82. SIEGEL, A.B.; CONNER, K.; WANG, S.; JACOBSON, J.S.; HERSHMAN, D.L.; HIDALGO, R.; VERNA, E.C.; HALAZUN, K.; BRUBAKER, W.; ZARETSKY, J.; et al. Smoking and hepatocellular carcinoma mortality. *Exp. Ther. Med.* **2011**, *3*, 124–128.
83. Liu, P.; Xie, S.-H.; Hu, S.; Cheng, X.; Gao, T.; Zhang, C.; Song, Z. Age-specific sex difference in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *Oncotarget* **2017**, *8*, 68131–68137.
84. Ladenheim, M.R.; Kim, N.G.; Nguyen, P.; Le, A.; Stefanick, M.L.; Garcia, G.;



- Nguyen, M.H. Sex differences in disease presentation, treatment and clinical outcomes of patients with hepatocellular carcinoma: a single-centre cohort study. *BMJ Open Gastroenterol.* **2016**, *3*, e000107.
85. McGlynn, K.A.; Sahasrabudhe, V. V; Campbell, P.T.; Graubard, B.I.; Chen, J.; Schwartz, L.M.; Petrick, J.L.; Alavanja, M.C.; Andreotti, G.; Boggs, D.A.; et al. Reproductive factors, exogenous hormone use and risk of hepatocellular carcinoma among US women: results from the Liver Cancer Pooling Project. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 1266–1272.
86. Manieri, E.; Herrera-Melle, L.; Mora, A.; Tomás-Loba, A.; Leiva-Vega, L.; Fernández, D.I.; Rodríguez, E.; Morán, L.; Hernández-Cosido, L.; Torres, J.L.; et al. Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence. *J. Exp. Med.* **2019**, *216*, 1108–1119.
87. Yeh, S.H. Estrogen in regulating the gender disparity of hepatocellular carcinoma. In *Female Sex Hormones and Cancers*; 2012.
88. Trenti, A.; Tedesco, S.; Boscaro, C.; Trevisi, L.; Bolego, C.; Cignarella, A. Estrogen, angiogenesis, immunity and cell metabolism: Solving the puzzle. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, *19*.
89. Shi, L.; Feng, Y.; Lin, H.; Ma, R.; Cai, X. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 93.
90. Montano-Loza, A.J.; Mazurak, V.C.; Ebadi, M.; Meza-Junco, J.; Sawyer, M.B.; Baracos, V.E.; Kneteman, N. Visceral adiposity increases risk for hepatocellular carcinoma in male patients with cirrhosis and recurrence after liver transplant. *Hepatology* **2018**, *67*.
91. Ploeger, C.; Waldburger, N.; Fraas, A.; Goeppert, B.; Pusch, S.; Breuhahn, K.; Wang, X.W.; Schirmacher, P.; Roessler, S. Tumor suppressor genes SORBS3 and SH2D4A collaborate to repress inter/STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Z. Gastroenterol.* **2016**, *54*.
92. Wu, E.M.; Wong, L.L.; Hernandez, B.Y.; Ji, J.-F.; Jia, W.; Kwee, S.A.; Kalathil, S. Gender differences in hepatocellular cancer: disparities in nonalcoholic fatty liver

- disease/steatohepatitis and liver transplantation. *Hepatoma Res.* **2018**, *4*, 66.
93. Kumar, R.; Goh, B.-B.G.; Kam, J.-W.; Chang, P.-E.; Tan, C.-K. Comparisons between non-alcoholic steatohepatitis and alcohol-related hepatocellular carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.* **2020**, *26*, 196–208.
  94. Ismail, I.T.; Fiehn, O.; Elfert, A.; Helal, M.; Salama, I.; El-Said, H. Sugar Alcohols Have a Key Role in Pathogenesis of Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma in Whole Blood and Liver Tissues. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 484.
  95. Bhurwal, A.; Yoshitake, S.; Pioppo, L.; Dellatore, P.; Rattan, P.; Reja, M.; Rustgi, V.K. Mo1408 INVERSE ASSOCIATION OF COFFEE AND HCC DEVELOPMENT : A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *Gastroenterology* **2020**, *158*.
  96. Montella, M.; Crispo, A.; Guidice, A. HCC, diet and metabolic factors: Diet and HCC - PubMed. *Hepat. Mon.* **2011**, *11*, 159–162.
  97. Wiesner, R.; Edwards, E.; Freeman, R.; Harper, A.; Kim, R.; Kamath, P.; Kremers, W.; Lake, J.; Howard, T.; Merion, R.M.; et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* **2003**, *124*.
  98. Zhai, M.; Long, J.; Liu, S.; Liu, C.; Li, L.; Yang, L.; Li, Y.; Shu, B. The burden of liver cirrhosis and underlying etiologies: results from the global burden of disease study 2017. *Aging (Albany, NY)*. **2021**, *13*.
  99. Younossi, Z.; Tacke, F.; Arrese, M.; Chander Sharma, B.; Mostafa, I.; Bugianesi, E.; Wai-Sun Wong, V.; Yilmaz, Y.; George, J.; Fan, J.; et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2019**, *69*.
  100. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34.
  101. Nayak, N.C. Cirrhosis and end-stage chronic liver disease: The changing scenes on etiopathogenesis. *Curr. Med. Res. Pract.* **2014**, *4*.
  102. Choi, J.; Lim, Y.S. Comparison of risk of hepatocellular carcinoma between tenofovir and entecavir: One direction or no direction. *J. Hepatol.* **2019**, *71*.

103. Griswold, G.; Aga, ; University, K.; Karachi, P.; Howell, J.; Cooke, G.S.; Andrieux-Meyer, I.; Applegate, T.L.; Atun, R.; Burry, J.R.; et al. *Accelerating the elimination of viral hepatitis: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission UNDER EMBARGO (not for distribution) (not for distribution) The Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission*; 2019; Vol. 4;.
104. Pawlotsky, J.M.; Feld, J.J.; Zeuzem, S.; Hoofnagle, J.H. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J. Hepatol.* 2015, 62.
105. Heindryckx, F.; Gerwins, P. Targeting the tumor stroma in hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* **2014**, 7, 165.
106. Welti, J.; Loges, S.; Dimmeler, S.; Carmeliet, P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* 2013, 123.
107. Wu, S. Di; Ma, Y.S.; Fang, Y.; Liu, L.L.; Fu, D.; Shen, X.Z. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat. Rev.* 2012, 38.
108. Giannelli, G.; Rani, B.; Dituri, F.; Cao, Y.; Palasciano, G. Moving towards personalised therapy in patients with hepatocellular carcinoma: the role of the microenvironment. *Gut* **2014**, 63, 1668–1676.
109. Ciccarone, F.; Castelli, S.; Ciriolo, M.R. Oxidative Stress-Driven Autophagy acROSs Onset and Therapeutic Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 2019, 1–10.
110. Tian, Z.; Hou, X.; Liu, W.; Han, Z.; Wei, L. Macrophages and hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci.* 2019, 9.
111. Negro, F. Natural history of NASH and HCC. *Liver Int.* **2020**, 40, 72–76.
112. Durand, F.; Levitsky, J.; Cauchy, F.; Gilgenkrantz, H.; Soubrane, O.; Francoz, C. Age and liver transplantation. *J. Hepatol.* 2019, 70.
113. Zhou, J.; Hu, Z.; Zhang, Q.; Li, Z.; Xiang, J.; Yan, S.; Wu, J.; Zhang, M.; Zheng, S. Spectrum of de novo cancers and predictors in liver transplantation: Analysis of the scientific registry of transplant recipients database. *PLoS One* **2016**, 11.

114. Watt, K.D.S.; Pedersen, R.A.; Kremers, W.K.; Heimbach, J.K.; Sanchez, W.; Gores, G.J. Long-term Probability of and Mortality From De Novo Malignancy After Liver Transplantation. *Gastroenterology* **2009**, *137*.
115. Keswani, R.N.; Ahmed, A.; Keeffe, E.B. Older age and liver transplantation: A review. *Liver Transplant.* 2004, *10*.
116. Ferla, F.; Lauterio, A.; De Carlis, R.; Di Sandro, S.; Petrucciani, N.; Benuzzi, L.; De Carlis, L. Comment on the article “Age and liver transplantation.” *J. Hepatol.* 2019, *70*.
117. Agosti, P.; Sabbà, C.; Mazzocca, A. Emerging metabolic risk factors in hepatocellular carcinoma and their influence on the liver microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 607–617.
118. Asfari, M.M.; Sarmini, M.T.; Baidoun, F.; McCullough, A. Mo1457 – The Risk of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients with Hbv and Hcv Infection: Not an Equal Opportunity. *Gastroenterology* **2019**, *156*, S-1313.
119. Hauner, H. Insulin resistance and the metabolic syndrome—a challenge of the new millennium. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, *56*.
120. Sokolich, J.; Buggs, J.; Fuentes, A.; Rogers, E.; Kumar, A.; Alsina, A.; Bowers, V. Survival and HCC recurrence after liver transplant due to NASH related HCC vs. non-nash related HCC. *HPB* **2018**, *20*, S79.
121. Tahara, A.; Takasu, T. Therapeutic Effects of SGLT2 Inhibitor Ipragliflozin and Metformin on NASH in Type 2 Diabetic Mice. *Endocr. Res.* **2020**, *45*.
122. de Oliveira, S.; Houseright, R.A.; Graves, A.L.; Golenberg, N.; Korte, B.G.; Miskolci, V.; Huttenlocher, A. Metformin modulates innate immune-mediated inflammation and early progression of NAFLD-associated hepatocellular carcinoma in zebrafish. *J. Hepatol.* **2019**, *70*.
123. Gastaldelli, A.; Cusi, K. From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options. *JHEP Reports* **2019**, *1*.
124. Cusi, K. Treatment of patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: current approaches and future directions. *Diabetologia* 2016, *59*.

125. Mohamed, J.; Nazratun Nafizah, A.H.; Zariyantey, A.H.; Budin, S.B. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2016, *16*.
126. Younossi, Z.M.; Koenig, A.B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **2016**, *64*.
127. Samji, N.S.; Heda, R.; Kovalic, A.J.; Satapathy, S.K. Similarities and Differences Between Nonalcoholic Steatohepatitis and Other Causes of Cirrhosis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **2020**, *49*, 151–164.
128. Mari, M.; Caballero, F.; Colell, A.; Morales, A.; Caballeria, J.; Fernandez, A.; Enrich, C.; Fernandez-Checa, J.C.; García-Ruiz, C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* **2006**, *4*.
129. Ioannou, G.N.; Subramanian, S.; Chait, A.; Haigh, W.G.; Yeh, M.M.; Farrell, G.C.; Lee, S.P.; Savard, C. Cholesterol crystallization within hepatocyte lipid droplets and its role in murine NASH. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*.
130. Bieghs, V.; Hendriks, T.; Van Gorp, P.J.; Verheyen, F.; Guichot, Y.D.; Walenbergh, S.M.A.; Jeurissen, M.L.J.; Gijbels, M.; Rensen, S.S.; Bast, A.; et al. The cholesterol derivative 27-hydroxycholesterol reduces steatohepatitis in mice. *Gastroenterology* **2013**, *144*.
131. Wu, T.T.; Gao, Y.; Zheng, Y.Y.; Ma, Y.T.; Xie, X. Atherogenic index of plasma (AIP): A novel predictive indicator for the coronary artery disease in postmenopausal women. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*.
132. Dong, B.Y.; Mao, Y.Q.; Li, Z.Y.; Yu, F.J. The value of the atherogenic index of plasma in non-obese people with non-alcoholic fatty liver disease: A secondary analysis based on a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* **2020**, *19*.
133. Bedogni, G.; Miglioli, L.; Masutti, F.; Tiribelli, C.; Marchesini, G.; Bellentani, S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: The dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* **2005**, *42*.

134. Donati, G.; Stagni, B.; Piscaglia, F.; Venturoli, N.; Morselli-Labate, A.M.; Rasciti, L.; Bolondi, L. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: Role of insulin resistance. *Gut* **2004**, *53*.
135. Møller, S.; Bendtsen, F. The pathophysiology of arterial vasodilatation and hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Liver Int.* 2018, *38*.
136. S., L.; S., F.; B., S.; I., S.; L., B. Arterial hypertension and liver cirrhosis: The experience of a single liver unit. *J. Clin. Hypertens.* **2011**, *13*.
137. Zhou, B.; Bentham, J.; Di Cesare, M.; Bixby, H.; Danaei, G.; Cowan, M.J.; Paciorek, C.J.; Singh, G.; Hajifathalian, K.; Bennett, J.E.; et al. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet* **2017**, *389*.
138. Singal, A.K.; Salameh, H.; Kuo, Y.F.; Wiesner, R.H. Evolving frequency and outcomes of simultaneous liver kidney transplants based on liver disease etiology. *Transplantation* **2014**, *98*.
139. Musso, G.; Cassader, M.; Cohnen, S.; Pinach, S.; Saba, F.; Gambino, R. Emerging Liver-Kidney Interactions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Mol. Med.* 2015, *21*.
140. Targher, G.; Chonchol, M.B.; Byrne, C.D. CKD and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2014, *64*.
141. Malhotra, P.; Gill, R.K.; Saksena, S.; Alrefai, W.A. Disturbances in Cholesterol Homeostasis and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Front. Med.* 2020, *7*.
142. Lonardo, A.; Nascimbeni, F.; Mantovani, A.; Targher, G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J. Hepatol.* 2018, *68*.
143. Garg, K.; Brackett, S.; Hirsch, I.B.; Garg, S.K. NAFLD/NASH and Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* **2020**, *22*.
144. Yi, S.W.; Choi, J.S.; Yi, J.J.; Lee, Y. ho; Han, K.J. Risk factors for hepatocellular carcinoma by age, sex, and liver disorder status: A prospective cohort study in Korea. *Cancer* **2018**, *124*.

145. Koh, W.P.; Robien, K.; Wang, R.; Govindarajan, S.; Yuan, J.M.; Yu, M.C. Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: The Singapore Chinese Health Study. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*.
146. Chen, S.Y.; Wang, L.Y.; Lunn, R.M.; Tsai, W.Y.; Lee, P.H.; Lee, C.S.; Ahsan, H.; Zhang, Y.J.; Chen, C.J.; Santella, R.M. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Int. J. Cancer* **2002**, *99*.
147. Shih, W.L.; Chang, H.C.; Liaw, Y.F.; Lin, S.M.; Lee, S.D.; Chen, P.J.; Liu, C.J.; Lin, C.L.; Yu, M.W. Influences of tobacco and alcohol use on hepatocellular carcinoma survival. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*.
148. Wang, Y.H.; Chuang, Y.H.; Wu, C.F.; Jan, M.C.; Wu, W.J.; Lin, C.L.; Liu, C.J.; Yang, Y.C.; Chen, P.J.; Lin, S.M.; et al. Smoking and Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma Risk: The Mediating Roles of Viral Load and Alanine Aminotransferase. *Hepatology* **2019**, *69*.
149. Hassan, M.M.; Spitz, M.R.; Thomas, M.B.; El-Deeb, A.S.; Glover, K.Y.; Nguyen, N.T.; Chan, W.; Kaseb, A.; Curley, S.A.; Vauthey, J.N.; et al. Effect of different types of smoking and synergism with Hepatitis C virus on risk of hepatocellular carcinoma in American men and women: Case-control study. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*.
150. Kuper, H.; Tzonou, A.; Kaklamani, E.; Hsieh, C.C.; Lagiou, P.; Adami, H.O.; Trichopoulos, D.; Stuver, S.O. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **2000**, *85*.
151. Zarkovic, K.; Uchida, K.; Kolenc, D.; Hlupic, L.; Zarkovic, N. Tissue distribution of lipid peroxidation product acrolein in human colon carcinogenesis. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 543–52.
152. Zou, R.C.; Xiao, S.F.; Shi, Z.T.; Ke, Y.; Tang, H.R.; Wu, T.G.; Guo, Z.T.; Ni, F.; Li, W.X.; Wang, L. Identification of metabolism-associated pathways and genes involved in male and female liver cancer patients. *J. Theor. Biol.* **2019**, *480*.
153. Ruggieri, A.; Gagliardi, M.C.; Anticoli, S. Sex-Dependent Outcome of Hepatitis B and C Viruses Infections: Synergy of Sex Hormones and Immune Responses? *Front.*

*Immunol.* **2018**, *9*.

154. Dultz, G.; Graubard, B.I.; Martin, P.; Welker, M.-W.; Vermehren, J.; Zeuzem, S.; McGlynn, K.A.; Welzel, T.M. Liver transplantation for chronic hepatitis C virus infection in the United States 2002–2014: An analysis of the UNOS/OPTN registry. *PLoS One* **2017**, *12*, e0186898.
155. Ji, C.; Kozak, K.R.; Marnett, L.J. IkappaB kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18223–8.



## 8. SAŽETAK

Oksidacijski stres je narušena redoks ravnoteža u stanici i organizmu. Zahvaća sve stanične molekule s različitim posljedicama. Tako na DNA uzrokuje mutacije, proteine inaktivira ili im modulira aktivnost, a kod lipida uzrokuje LPO. Posljedice LPO su višestruke, preko djelovanja na DNA uzrokujući mutacije do raspadanja stanične membrane i neminovne stanične smrti. Iz toga razloga su oksidacijski stres i LPO putem reaktivnih aldehida, kao što su 4-hidroksi-2-nonenal i akrolein, povezani s karcinogenezom. Jedan od glavnih čimbenika rizika za nastanak HCC-a je dugotrajna izloženost kroničnoj upali. Kronična upala izaziva OS, stoga je cilj istraživanja bio usporediti izaziva li kronična upala uzrokovane virusnom infekcijom ili alkoholom promjenu u oksidacijskom stresu. Rad je utvrdio da na nastanak HCC-a ne utječe samo virusna upala, uz prateće tumoru pridružene makrofage i LPO, nego i vanjskim čimbenici rizika (npr. alkohol, pušenje, pretilost, dob i spol) koji bi mogli utjecati na akrolein. Akrolein može nastati ako posljedica LPO, ali može biti unesen u organizam i pušenjem, koji je od ovih potencijalnih uzorka odgovoran za razlike akroleina još je potrebno istražiti. Međutim, jednom kad se razvije hepatocelularni karcinom, smanjuje se razina ovog aldehida i parametri upale gledani putem CD68, što ukazuje na njegovu mogućnost reguliranja oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite, što u konačnici vodi preživljenju. Svakako, saznanja o utjecaju LPO, uzrokovane endogenim i egzogenim čimbenicima, pomogli bi pri dijagnostici i liječenju ove maligne bolesti uzrokovane kroničnom upalom ili virusnom infekcijom.

## 9. SUMMARY

Oxidative stress is a disturbed redox balance in the cell and the body. It affects all cellular molecules with different consequences. Thus, it causes mutations in DNA, inactivates proteins, or modulates their activity, and in lipids, it causes lipid peroxidation. The consequences of lipid peroxidation are multiple, from the action on DNA by causing mutations, to cell membrane breakdown and inevitable cell death. For this reason, oxidative stress and lipid peroxidation via reactive aldehydes, such as 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein, are associated with carcinogenesis. One of the main risk factors for developing hepatocellular carcinoma is long-term exposure to chronic inflammation. Chronic inflammation causes oxidative stress, so the aim of the study was to compare chronic inflammation caused by viral infection or alcohol across oxidative stress parameters (reactive aldehyde formation).

Our research found that the mechanism of HCC formation is not only influenced by viral inflammation accompanied by tumor-associated macrophages and lipid peroxidation but is also related to external risk factors (eg. alcohol, smoking, obesity, age, and gender) and their relation to the lipid peroxidation. Oxidative damage to liver tissue due to inflammation is significantly increased in viral infection compared to alcoholic etiology. Acrolein stands out in the development of hepatocellular carcinoma, especially in lipid peroxidation. Acrolein can be formed as a result of lipid peroxidation, but it can also be introduced into the body by smoking. Which of these potential causes is the one responsible for the difference in acrolein intake still needs to be a target of an investigation. However, once hepatocellular carcinoma develops, it reduces the levels of this aldehyde and reduces the parameters of inflammation, seen through CD68, which indicates its ability to regulate oxidative stress and antioxidant protection leading to survival. Certainly, knowledge about the impact of lipid peroxidation caused by endogenous and exogenous factors would help in the diagnosis and treatment of this malignant disease caused by chronic inflammation or viral infection.

## 10. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Ivana Acan, dr.med., specijalist anesteziologije i intenzivnog liječenja, subspecijalist intenzivne medicine. Rođena sam 27. prosinca 1976. godine u Pakracu. Osnovnu školu Mato Lovrak i Srednju školu za zdravstvene tehničare završila sam u Zagrebu. Medicinski fakultet u Zagrebu upisala sam 1996.godine i diplomirala 2002.godine. Obvezatni pripravnički staž u trajanju 1 godine završila sam u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ u Zagrebu. Po položenom stručnom ispitu i pridobivanju liječničke licence, radila sam od 2004. godine do 2007.godine u Zavodu za hitnu medicinu Grada Zagreba.

U kolovozu 2007.godine započela sam specijalizaciju iz Anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja u Kliničkoj bolnici Merkur u Zagrebu. Nakon položenog specijalističkog ispita 2012. godine radim kao specijalist anesteziolog na Odjelu za anesteziju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Kliničke bolnice Merkur i upisujem Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij „Molekularne bioznanosti“ na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer u Osijeku u suradnji s Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilištem u Dubrovniku.

2013. godine započela sam subspecijalističko usavršavanje iz intenzivne medicine, od 2016. godine radim kao subspecijalista intenzivne medicine na matičnom Odjelu za anesteziju, reanimatologiju i intenzivnu medicinu u Kliničkoj bolnici Merkur.

Od 2020. godine zaposlena sam u Univerzitetnom kliničkom centru Ljubljana na Kliničnom odjelku za anesteziologiju in intenzivno terapijo operativnih strok.

Autor sam i koautor više postera i stručnih publikacija te sam sudjelovala na raznim znanstvenim i stručnim skupovima. Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora te Hrvatskog društva za intenzivnu medicinu.

Aktivno se služim engleskim, francuskim i slovenskim jezikom uz odlično znanje programskog paketa Microsoft Office.

## 11. POPIS RADOVA

1. Brusich, K.; Acan, I.; Filipcic, N. Hydroxyethyl Starch- Friend or Foe? *Br. J. Med. Med. Res.* **2016**, *11*, doi:10.9734/bjmmr/2016/20278.
2. Brusich, K.T.; Acan, I. Oral Prednisone Increased Quality of Analgesia after Single-Shot Supraclavicular Nerve Block. *Analg. Resusc. Curr. Res.* **2016**, *05*, doi:10.4172/2324-903x.1000138c.
3. Viskovic Filipcic, I.A. Sepsis- Induced Refractory Status Epilepticus: A Case Report. *Analg. Resusc. Curr. Res.* **2014**, *03*, doi:10.4172/2324-903x.1000114.
4. Brusich, K.T.; Acan, I.; Filipcic, N. V; Gustin, D. Liver transplantation: An adventure for the anaesthesiologist. *OA Anaesth.* **2013**, *1*, doi:10.13172/2052-7853-1-2-843.
5. Brusich, K.T.; Acan, I.; Filipcic, N.V.; Gustin, D. Anaesthesia for renal transplant surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.* **2013**, *30*, doi:10.1097/EJA.0b013e328362a708.
6. Tomulic, K.; Saric, J.P.; Kocman, B.; Skrtic, A.; Filipcic, N.V.; Acan, I. Successful management of unsuspected retroperitoneal paraganglioma via the use of combined epidural and general anesthesia: A case report. *J. Med. Case Rep.* **2013**, *7*, doi:10.1186/1752-1947-7-58.
7. Cavrić, G.; Njerš, K.; Prkačin, I.; Ilić, D.; Bartolek, D.; Erdelez, L.; Acan, I. Septic deep venous thrombosis and ruptured pseudoaneurysm in an intravenous addict. *Neurol. Croat.* **2013**, *62*.
8. Tomulic, B.K.; Acan, I.; Viskovic, F.N.; Vondra, S.J. Incidence and clinical outcome of ventilator-associated pneumonia among transplanted patients. *Eur. J. Anaesthesiol.* **2013**, *30*, doi:10.1097/00003643-201306001-00569.
9. Tomulic, K.; Acan, I.; Viskovic Filipcic, N. Levosimendan in management of critical care patients after orthotopic liver transplantation. *Eur. J. Anaesthesiol.* **2012**, *29*, doi:10.1097/00003643-201206001-00598.
10. Tomulic, K.; Pavicic, S.J.; Acan, I. Effect of age on anaesthetic volume for ultrasound guided supraclavicular brachial plexus block. *Eur. J. Anaesthesiol.* **2011**, *28*, doi:10.1097/00003643-201106001-00361.